

E.T.S. de Ingeniería Industrial,
Informática y de Telecomunicación

Sensor óptico colorimétrico de Peróxido de Hidrógeno con doble referencia basado en nanopartículas de oro y plata.



Grado en Ingeniería
en Tecnologías Industriales

Trabajo Fin de Grado

Elia Ibáñez Puy

Tutores: Pedro José Rivero Fuente y Javier
Goicoechea Fernández

Pamplona, 5 de Septiembre de 2016



ÍNDICE.

1. Introducción.....	1
2. Objetivos.....	3
3. Materiales y método experimental.....	4
3.1. Agente Encapsulante.....	5
3.2. Agente reductor.....	6
3.3. Agentes precursores.....	6
3.4. Técnicas de caracterización de las dispersiones de nanopartículas.....	6
4. Síntesis de las dispersiones de nanopartículas.....	9
4.1. Planteamiento de los experimentos.....	9
4.2. Síntesis de nanopartículas: estudio de distintos encapsulantes.....	13
4.2.1. Síntesis con PAA.....	13
4.2.2. Síntesis con PAH.....	18
4.2.3. Síntesis con PSS.....	22
4.2.4. Síntesis con PDDA.....	25
4.3. Conclusiones de la síntesis de nanopartículas.....	29
5. Dispersiones combinadas con distintas nanopartículas.....	32
5.1. Selección del medio encapsulante.....	33
5.1.1. PAA:.....	33
5.1.2. PAH.....	36
5.1.3. PSS.....	38
5.1.4. PDDA.....	40
6. Sensibilidad de las muestras.....	42
6.1. Efecto H ₂ O ₂	43
6.2. Pruebas H ₂ O ₂	54
6.2.1. PSS.....	54
6.2.2. PDDA.....	57
7. Conclusiones y líneas futuras.....	64
8. Bibliografía.....	66

Introducción y objetivos.

1. Introducción.

La nanociencia se dedica al estudio del comportamiento de la materia a escala nanométrica. El nanómetro es la unidad de longitud que equivale a una millonésima parte de un metro. Por otro lado, se entiende por nanotecnología el conjunto de técnicas que se dedica a la manipulación y producción de átomos y moléculas con el fin de obtener estructuras con una escala nanométrica (0,1 a 100nm) [1],[2]

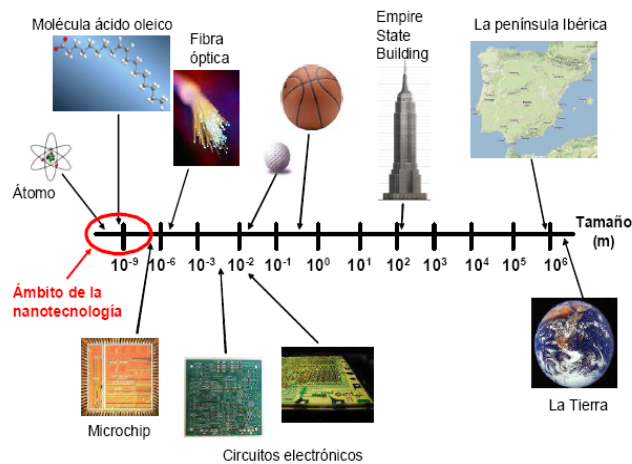


Ilustración 1: La imagen permite situar la escala en la que se encuentra la nanotecnología dentro de los tamaños de estudio más comunes.

El objetivo de la nanotecnología es la obtención de materiales mejorados y con nuevas propiedades. Esto es posible debido a que las propiedades físicas, químicas y/o biológicas de la materia (conductividad eléctrica, rugosidad, color, resistencia, elasticidad) difieren de forma fundamental en tamaño nanométrico o micro/macrocópico.

La posibilidad de aplicar la nanotecnología a la mayoría de los campos de estudio de la sociedad actual: medicina, energía, electrónica, etc. Implica que el desarrollo de esta ciencia puede suponer una auténtica revolución con la obtención de innovadoras aplicaciones. Dentro de la nanotecnología, los metales nobles (oro, plata, platino) [3]–[5] resultan ser los materiales más atractivos para utilizar en la gran mayoría de campos de aplicación: biología, medicina, electrónica, etc [6], [7]. La nanopartículas de oro y plata son especialmente utilizadas en aplicaciones para la biomedicina, concretamente en la construcción de biosensores para la detección de enfermedades con una alta sensibilidad. [8]–[10][11], [12]. Cabe destacar que el control de la morfología de las nanopartículas para estas aplicaciones es de vital importancia, ya que el comportamiento de las mismas no es igual si presentan forma esférica, formas irregulares o anisotrópicas. [4], [5], [13], [14]

Dentro de los metales, la plata presenta una característica de especial interés para muchas aplicaciones dentro de los campos de la industria alimentaria, la medicina o la cosmética, ya que se trata de un elemento altamente antibacteriano que

Introducción y objetivos.

presenta una alta eficiencia antimicrobiana frente a bacterias, virus y otros microorganismos.[15], [16] además de ser biocompatible.

Además, las nanopartículas de metal permiten trabajar con el fenómeno conocido como LSPR. Esto les convierte en las candidatas perfectas para aplicaciones de sensores ópticos.[17]. LSPR (Localized Surface Plamon Resonance), son las siglas en inglés de resonancia de plasmón superficial localizada. Se base en el fundamento físico de la oscilación colectiva y coherente de los electrones en la banda de conducción de una nanopartícula metálica cuando incide sobre ella radiación electromagnética que produce resonancia con los electrones.

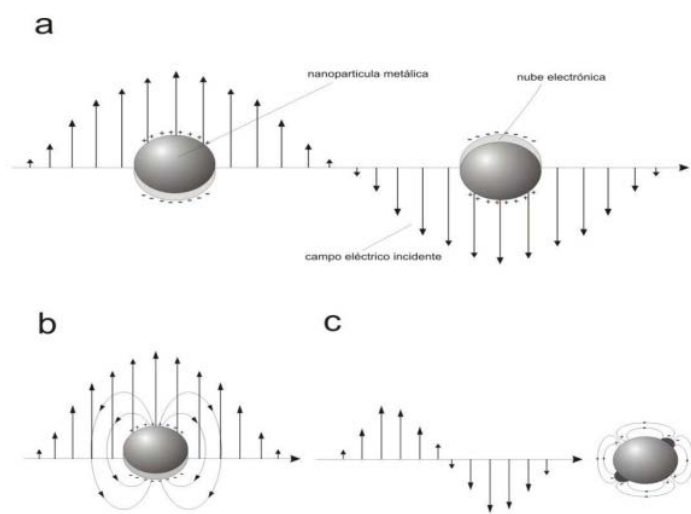


Figura 1: Esquema del fundamento del LSPR. Se puede observar que el comportamiento depende de la morfología que presenta la partícula [18].

Esta técnica es de vital importancia ya que permite deducir la morfología de las nanopartículas, esto se debe a que la incidencia de las ondas sobre las partículas se comporta de manera diferente según el tamaño y la forma de la partícula. A su vez también se puede deducir el color que presenta la misma en el espectro visible., ya cuando ocurre la resonancia plasmónica en los metales, aumenta la absorción de la luz del material y aparece el llamado, pico de absorción, a diferente longitudes de onda según el color. [18][19]. Esta teoría fue enunciada ya por M. Faraday (1857) en unas de sus múltiples investigaciones en la que indicó que la variación de color está relacionada con la interacción de la luz con las diversas morfologías de partículas más pequeñas que la longitud de onda.

Las nanopartículas metálicas pueden ser sintetizadas en estado sólido, líquido o gaseoso atendiendo principalmente a dos métodos "top-down" y "bottom down". [20] Tras la primera fase de síntesis se pueden obtener las nanopartículas en solución [21], que resulta más simple y económico o se pueden depositar en films, lo que implica unas condiciones específicas más exigentes [4], [5].

Introducción y objetivos.

Este trabajo se centra en la síntesis en vía húmeda para la obtención de nanopartículas estables y con una morfología controlada. Se trabaja con nanopartículas de oro y plata de forma esferoidal, y se realiza un estudio exhaustivo de múltiples factores como la concentración y el pH, para seleccionar el mejor agente encapsulante con el objetivo de obtener un sensor colorimétrico [22],[10],[11] basado en la estabilidad del oro frente a la reactividad de la plata ante el contacto con peróxido de hidrógeno.

2. Objetivos.

El objetivo de esta primera parte del proyecto es realizar un estudio comparativo de las diferentes matrices de colores que se obtienen con la síntesis de nanopartículas de oro y plata utilizando diferente polielectrolitos, que actúan como agente encapsulante. Se requiere analizar el efecto que posee la utilización de diferentes encapsulantes en el comportamiento de las nanopartículas. Una vez se realiza esta primera reacción entra en juego otro agente, el DMAB, al que se llamará agente reductor. Este agente es el que aporta el color a las muestras.

Se busca obtener un diseño de experimentos en vía húmeda (en disolución) modificando tres parámetros fundamentales:

- El pH: Se trabaja con tres pH ácido (5), base (7) y neutro (9).
- La concentración de agente encapsulante: 5mM, 10mM y 25mM.
- La concentración del agente reductor: 5 μ L, 25 μ L, 50 μ L, 100 μ L y 500 μ L.

Materiales y método experimental.

3. Materiales y método experimental.

El proceso de síntesis de nanopartículas en vía húmeda consiste en una reducción química de sales de metal. La síntesis se debe realizar en disolución de un agente encapsulante para asegurar la estabilidad de las nanopartículas en las reacciones posteriores, así como con el paso del tiempo una vez sintetizadas, en este trabajo se utilizan polielectrolitos. Cabe destacar que realizan una función vital ya que la coloración obtenida tras la síntesis se mantiene tras 6 meses de almacenamiento sin signos significativos de agregación en ambos tipos de partículas. La fuente de partículas de oro y plata se obtiene a través de agentes precursores (AgNO_3 y HAuCl_4). Para provocar la reducción de los iones metálicos en nanopartículas es necesaria la adición de un agente reductor, en este caso, DMAB.

Polielectrolito + Agente Precursor + Agente reductor \rightarrow Nanopartículas metálicas

PAA,PAH,PSS,PDDA + AgNO_3 / HAuCl_4 + DMAB \rightarrow AgNPs /AuNPs

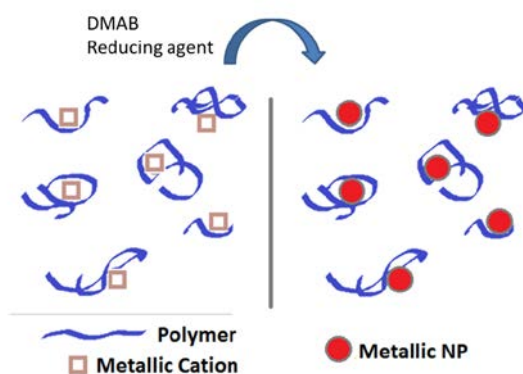


Diagrama esquemático en el que se muestra el proceso de síntesis de las nanopartículas metálicas y el papel que juegan los agentes encapsulantes y reductores en el proceso de reducción de los cationes metálicos y la creación de dispersiones estables de nanopartículas.

A continuación se va a realizar una breve explicación de los elementos utilizados en las síntesis para facilitar el entendimiento del proceso realizado.

Materiales y método experimental.

3.1. Agente Encapsulante.

Como ya se ha indicado, en esta investigación se utilizan polielectrolitos como agente encapsulante (protective agent), cuya misión es estabilizar las nanopartículas de Au y Ag que se van a sintetizar.

Los polielectrolitos son polímeros compuestos por unidades monoméricas que poseen un grupo electrolito. Se pueden clasificar en:

- Policaciones: aportan cargas positivas. Por ejemplo: Poly Allylamine hydrochloride (PAH) y Poly (styrenesulfonate) (PSS)
- Polianiones: aportan cargas negativas. Como Poly (acrylic acid sodium salt) (PAA) y Poly (diallyldimethylammonium chloride) (PDDA).

Este tipo de polímero se disocia en disoluciones acuosas dando como resultado un polímero cargado y por tanto, disoluciones eléctricamente conductoras. Este agente se utiliza como encapsulante y permite que las partículas de plata y oro sintetizadas, que inicialmente y de manera natural son neutras, presenten cargas en disolución.

A su vez existe una segunda posibilidad de clasificación según el grado de disociaciones que presentan en disolución los grupos ionizables. Los polielectrolitos pueden poseer:

- Carácter Débil: Disociables en un intervalo restringido de pH (por ejemplo PAA y PAH). Esto conlleva que el polielectrolito no está totalmente cargado y su carga fraccional puede ser modificada.
- Carácter Fuerte: Disociables en todo el intervalo de pH para sistemas acuosos (por ejemplo PSS y PDDA). Es decir, en disolución su carga no se ve afectada con los cambios de pH.

Durante el desarrollo de este proyecto se ha trabajado con cuatro polielectrolitos. A continuación, se van a describir las principales características de cada uno así como la estructura química que presenta.

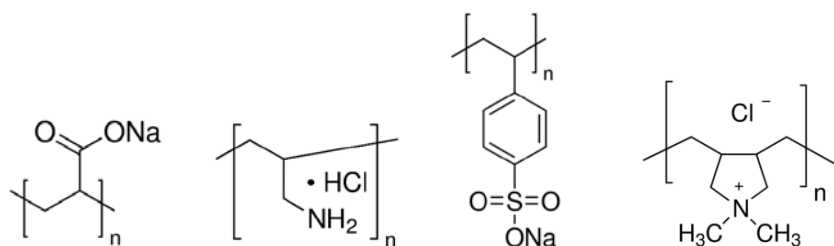


Figura 2: Estructura química de los diferentes polielectrolitos utilizados en el proyecto. a) PAA: Poly (acrylic acid sodium salt) b) PAH: Poly Allylamine hydrochloride c) PSS: Poly (styrenesulfonate) d) PDDA: Poly (diallyldimethylammonium chloride)

Materiales y método experimental.

3.2. Agente reductor.

El DMAB o *Dimethylamine Borane* es el agente reductor con el que se trabaja en el proyecto. El efecto que produce es transformar los iones de oro o plata en nanopartículas: $\text{Ag}^+/\text{Au}^+ \rightarrow \text{AgNPs/AuNPs}$

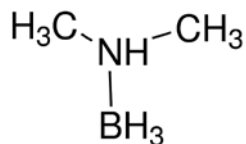


Figura 3: Estructura química del DMAB.

3.3. Agentes precursores.

Como ya se ha indicado al principio del apartado, el objetivo principal es realizar una síntesis de partículas de plata y oro. Para ello, se utilizan agentes precursores como fuentes de iones metálicos de plata (Ag^+) y de oro (Au^+). En el proyecto se ha utilizado el nitrato de plata (AgNO_3) como compuesto químico que aporta los iones de plata y el ácido tetracloroaurico (HAuCl_4) como el encargado de aportar los iones de oro.

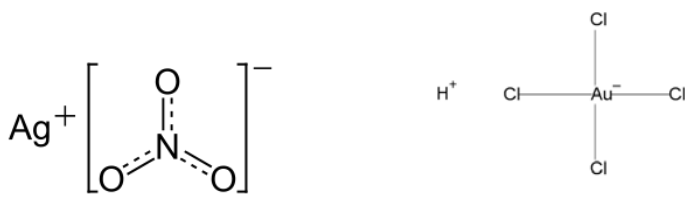


Figura 4: Estructuras químicas de los agentes precursores (AgNO_3) y (HAuCl_4)

3.4. Técnicas de caracterización de las dispersiones de nanopartículas.

Para caracterizar las dispersiones de las nanopartículas sintetizadas se emplearán principalmente dos tipos de técnicas de caracterización. La técnica más empleada es la espectrometría UV-VIS. También se emplearán técnicas de microscopía electrónica de transmisión para la visualización de las nanopartículas y el estudio de su tamaño, forma, estado de agregación e integridad.

Materiales y método experimental.

En cuanto a las técnicas de caracterización UV-VIS se emplearon dos montajes experimentales distintos. El dispositivo que ofrece unas medidas de más calidad es el espectrómetro JASCO V300. Su principal limitación es que se requiere un volumen de medida para la muestra de unos 3ml, y que el proceso de medida es relativamente lento.

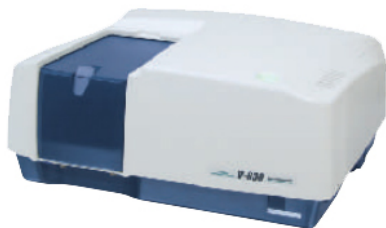


Ilustración 2: Espectrofotómetro UV-VIS empleado para la caracterización óptica de las dispersiones

No obstante, la fase inicial del estudio de la síntesis de las nanopartículas de oro y plata con distintos encapsulantes, requerirá la realización de muchas medidas, y por motivos de economía de material fungible y también de tiempo, es necesario recurrir a un montaje experimental que proporcione medidas con volúmenes de muestra inferiores y en menos tiempo. De esta manera se llevó a cabo un montaje experimental en el laboratorio consistente en una fuente de luz blanca (DH2000, Oceanoptics), un espectrómetro CCD (HR4000 Oceanoptics) y una fibra óptica bifurcada de 200µm de núcleo con una terminación en lente colimadora. Este montaje supuso una forma sencilla de caracterizar la característica espectral de las distintas dispersiones directamente sobre los pocillos de una placa microtiter. Cada pocillo suele albergar un volumen de aproximadamente 300µl.

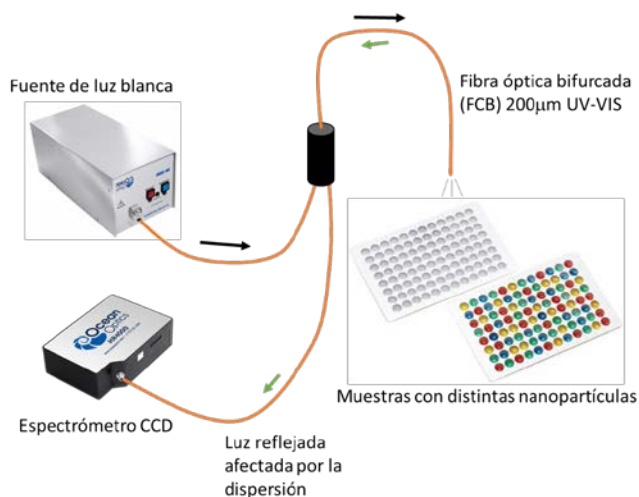


Ilustración 3: Montaje experimental empleado para caracterizar las dispersiones de forma rápida y económica en placas microtiter.

Materiales y método experimental.

Las medidas de Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM) se llevaron a cabo en el departamento de histología de la Universidad de Navarra, en un microscopio Carl Zeiss Libra 120.



Ilustración 4: Microscopio TEM empleado para la caracterización de las nanopartículas contenidas en las diferentes dispersiones

Síntesis de las dispersiones de nanopartículas

4. Síntesis de las dispersiones de nanopartículas.

Tras realizar una breve explicación de los fundamentos teóricos se comienza a explicar la fase experimental. Esta fase consta de varias etapas, desde la determinación del procedimiento de síntesis óptimo hasta la obtención de una aplicación real en un sensor colorimétrico.

4.1. Planteamiento de los experimentos.

En esta fase inicial de síntesis se realiza un diseño de experimentos en donde se evalúa el efecto del agente encapsulante a diferentes concentraciones del polielectrolito (5mM, 10mM y 25mM), variando el ratio agente reductor/ agente precursor de iones y analizando el efecto del pH (ácido, base y neutro), como ya se ha indicado anteriormente.

Síntesis 1:

Se comenzó a realizar la síntesis utilizando como protective agent PAA.

Disolución de PAA.

Se realizó una disolución de 500ml a [PAA]= 25mM, se dejó agitando durante más de dos horas. A continuación utilizando un aparato medidor de pH, para un elemento catiónico, y tras calibrarlo correctamente utilizando de referencia disoluciones de pH 4 y pH7, se midió el pH de la disolución de 500ml. Se obtiene en esta medición un pH en torno a 9.

Calibración de pH.

Se separa la muestra en 10 botes de 15ml de esta disolución a pH 9. Esta separación se realiza para posteriormente añadir el agente precursor (AgNO_3 / HAuCl_4) a una concentración fija en todos ellos, se toma 500 μl . Y posteriormente, tras dejar un periodo de agitación, añadir el agente reductor (DMAB) en 5 concentraciones variables.

Mediante la adición de HCl, se consigue neutralizar el pH de la disolución madre y se realiza el mismo procedimiento de separación de 10 muestras para un pH7 y pH5.

Adición de AgNO_3 .

Se separan 5 botes de cada pH y se procede a realizar la adición del agente precursor de plata. Las otras 15 muestras se guardan en el frigorífico. A cada muestra se le añaden 500 μl de AgNO_3 (0.1M). Las muestras se dejan agitando durante casi 3 horas y se guardan en el frigorífico. En este paso, se aprecia ya, que las muestras de pH5 presentan un color blanquecino y están turbias. Las de pH7 muestran el mismo fenómeno en menor proporción, y las de pH9 siguen manteniendo su transparencia.

Con el paso del tiempo, este fenómeno se magnifica. Las muestras de pH5 son totalmente blancas y la disolución es muy turbia. Las de pH7 también presentan turbidez aunque en menor grado, y las de pH9 siguen siendo transparentes. Al estar sintetizando con un elemento fotosensible, la plata, se observa que en contacto con la luz natural, las muestras con pH5 y pH7 cambian de tonalidad. Resultando aún más inutilizables.

Síntesis de las dispersiones de nanopartículas

Adición de DMAB.

A pesar de que no se han obtenido los resultados esperados, se continúa el procedimiento propuesto inicialmente con las muestras de pH9, que no son turbias. Se realiza la adición de 5 concentraciones diferentes de DMAB (10mM), (5, 25, 50, 100 y 500 μ L). Instantáneamente las muestras cambian de color. La de menor concentración de DMAB (5 μ L), presenta un tono violeta muy claro, conforme aumenta la concentración de agente reductor, el color que aparece va volviéndose más intenso hasta conseguir un rojizo e incluso tonos verdes intensos.

Conclusiones

A pesar de que con pH5 y pH7 no se ha conseguido el resultado deseado el procedimiento utilizado, con pH9 sí que se corrobora lo esperado. Se consiguen diferentes tonalidades según la concentración variable de DMAB.

El problema que se presenta es que no se consigue la síntesis de muestras con color con pH neutro y pH ácido, esto se puede deber a que se ha seleccionado una concentración de AgNO_3 (500 μ L) excesiva para el volumen de 15mL. Por esta razón, cuando se trabaja con pH más ácidos, se obtiene un color blanco y la plata llega incluso a precipitar.

Para evitar este primer inconveniente, se decide realizar un segundo procedimiento.

Síntesis 2.

A diferencia del primer procedimiento, en este caso, se ha decidido realizar la adición de AgNO_3 , antes de medir el pH, ya que se ha observado que el pH primitivo de la disolución se ve ligeramente modificado al añadir el AgNO_3 , y reducir la concentración de AgNO_3 en el volumen final.

Disolución PAA y adición AgNO_3 .

Se realiza una disolución de 200ml a $[\text{PAA}]=25\text{mM}$ y se añaden 200 μ L de AgNO_3 a 0.1M. Al realizar esta disolución se aprecia cierto cambio en el color de la muestra. A partir de esta disolución madre, se van a realizar dos disoluciones.

con $[\text{PAA}]=10\text{mM}$ (se separan 40mL de la muestra inicial (25mM) y se lleva la disolución hasta 100ml con agua ultrapura)

con $[\text{PAA}]=5\text{mM}$ (se separan 20mL de la muestra inicial de 25mM y se lleva la disolución a 100mL de H_2O ultrapura)

Medición de pH.

Una vez separadas las tres concentraciones, se realiza la medición de pH de la muestra con $[\text{PAA}]=25\text{mM}$. Se obtiene un resultado significativo, el pH de esta disolución se encuentra próximo a 5. La disolución es mucho más ácida que el primer procedimiento, y el único cambio realizado es la adición de AgNO_3 , por tanto este agente influye en el pH final de la disolución.

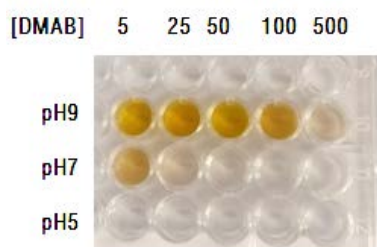
Se separa una muestra de 25mL a pH5, y se neutraliza el pH a través de la adición de NaOH, cuando se tiene pH7, se recoge otra muestra de 25mL y se repite el proceso para pH9.

Síntesis de las dispersiones de nanopartículas

Adición de DMAB.

Para cada pH, se realiza la siguiente operación. Se separa la muestra en 5 disoluciones de 5mL cada uno y a cada muestra de estas, se le añade una concentración de DMAB (misma parámetros del agente reductor que en primer procedimiento), sorprendentemente, solo se obtienen colores para las muestras de pH9, que presentan un color amarillo-anaranjado, más intenso conforme aumenta la concentración de agente reductor. Y para la muestra de pH7 con la mayor concentración de DMAB (500 μ L).

El resto de muestras de pH7 y todas las de pH5 no presentan una variación apreciable de color, como puede apreciarse en la imagen.



Matriz 1: Tonalidades obtenidas para el proceso de síntesis 2. Como se puede observar, sólo se obtienen colores para pH básicos y la intensidad aumenta a mayor concentración de DMAB.

Tras realizar estos dos procedimientos, se llega a la conclusión de que en el primero, la concentración de AgNO_3 era excesiva para el volumen utilizado. Pero la conclusión más interesante observando los resultados es, que con pH ácidos, el agente reductor (DMAB) no actúa y no se obtiene el cambio de color buscado.

Se puede abrir aquí una línea de investigación para obtener el límite de acidez, es decir, conocer a qué pH concreto, el agente reductor comienza a actuar produciendo un cambio de color apreciable. Como se ha indicado al principio, inicialmente se seleccionaron tres concentraciones de PAA diferentes (25, 10, 5 mM), aunque el desarrollo anterior se centra en la concentración más elevada, no se observa un cambio de comportamiento apreciable debido a este parámetro. Por esta razón, no se profundiza en los resultados de las demás y se continúa la investigación para obtener el procedimiento óptimo.

Síntesis 3

Tras realizar estas pruebas anteriores se decide realizar el siguiente procedimiento.

Con una disolución madre de 200ml a $[\text{PAA}]=25\text{mM}$, se separan disoluciones de 100ml de $[\text{PAA}]=10\text{mM}$, $[\text{PAA}]=5\text{mM}$ de la misma manera que en el procedimiento 2.

Síntesis de las dispersiones de nanopartículas

En este caso la medición de pH se va a realizar antes de la adición de AgNO_3 . Esperando que de esta forma no se produzca ese pequeño cambio de color y que no afecte a la acidez de la muestra. Se separaran 25mL de los tres pH con los que se está trabajando y se realizará, en ese punto, la adición de AgNO_3 fijando una concentración de 100 μL . Una vez realizada esta adición, se separarán en muestras de 5mL y se realizará la adición de DMAB con diferentes concentraciones, esperando obtener diferentes colores. Se repetirá para las disoluciones de 10mM y 5mM.

Estudio de distintos agentes encapsulantes

4.2. Síntesis de nanopartículas: estudio de distintos encapsulantes

Una vez se ha determinado el procedimiento más óptimo para seguir. Se comienza a realizar la síntesis de nanopartículas propiamente dicha. Se va a explicar para cada polielectrolito la obtención de sus dos matrices de colores, una con el agente precursor de plata y otra con el de oro.

4.2.1. Síntesis con PAA.

AgNO₃.

Se comienza con la síntesis de nanopartículas de plata con PAA a tres concentraciones distintas (25mM, 10mM y 5mM)

Al realizar la calibración del pH, se obtiene que el PAA presenta un pH primitivo básico, entre 8,5 -9. Para bajarlo y obtener disoluciones con pH7 y pH5 se añade HCl. Una vez realizada la separación por pH en muestras de 25mL se realiza la adición de AgNO₃. Con el paso del tiempo, se comprueba que las muestras con pH más ácidos presentan un color blanquecino aunque no tan turbio como en el primer procedimiento.

Se procede a separar cada disolución de pH en muestras de 5ml a las que se les añade diferentes concentraciones de DMAB (indicadas anteriormente).

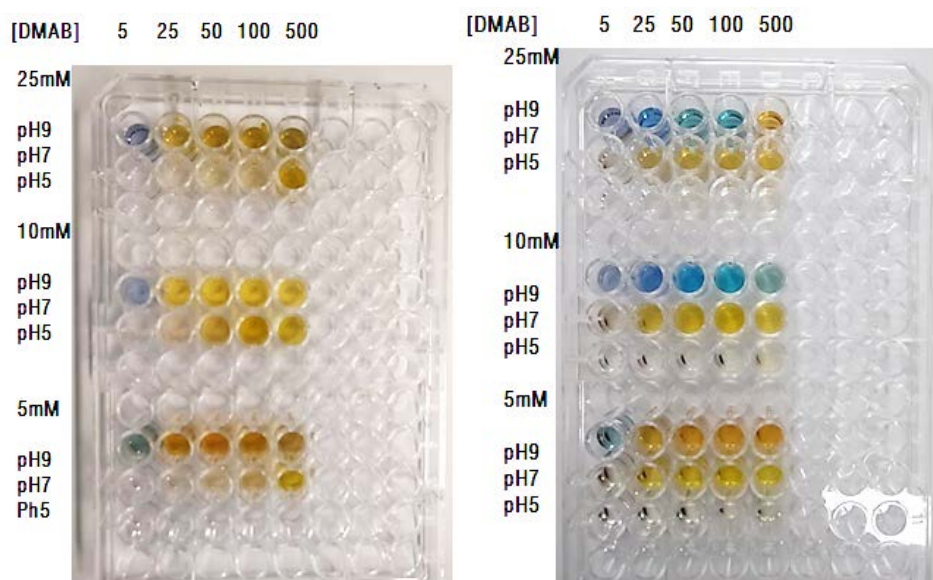
Al realizar esta adición, solo se obtiene el cambio de color esperado en las muestras de pH básico (pH9), sin embargo, en las de pH más ácidos no se aprecia un cambio de color tan significativo. (Matriz 3)

La conclusión a la que se llega, después de obtener los resultados de los procedimientos anteriores, es que la adición de HCl para aumentar la acidez de la disolución y el AgNO₃, reaccionan y no se tiene Ag⁺ libre para reaccionar con el DMAB, por eso no se obtiene una coloración. Esto explicaría también que en el primer ensayo que se hizo, se obtuvo un color blanco tan intenso y la disolución fue muy turbia, porque la concentración de plata era tan alta que se produjo precipitación.



Por tanto, se va a realizar un estudio exhaustivo de los pH primitivos de los polielectrolitos que se van a utilizar, ya que estos primeros ensayos se han realizado con PAA, que presenta un pH primitivo en torno a 8,5. Si se tienen polyelectrolitos con pH ácidos, no se presentará el problema planteado anteriormente ya que no se necesitará añadir HCl. Si nos encontramos con una disolución con pH base que tendremos que neutralizar, se probará con otro compuesto que no presente problemas de reacción con el AgNO₃.

Una semana después de realizar la síntesis con PAA, se observan cambios en la coloración de las muestras. Se produce el fenómeno conocido como *blue silver* [23], [24] en el que las nanopartículas de plata presentan colores azulados por la formación de agregados de plata de tamaño micrométrico.

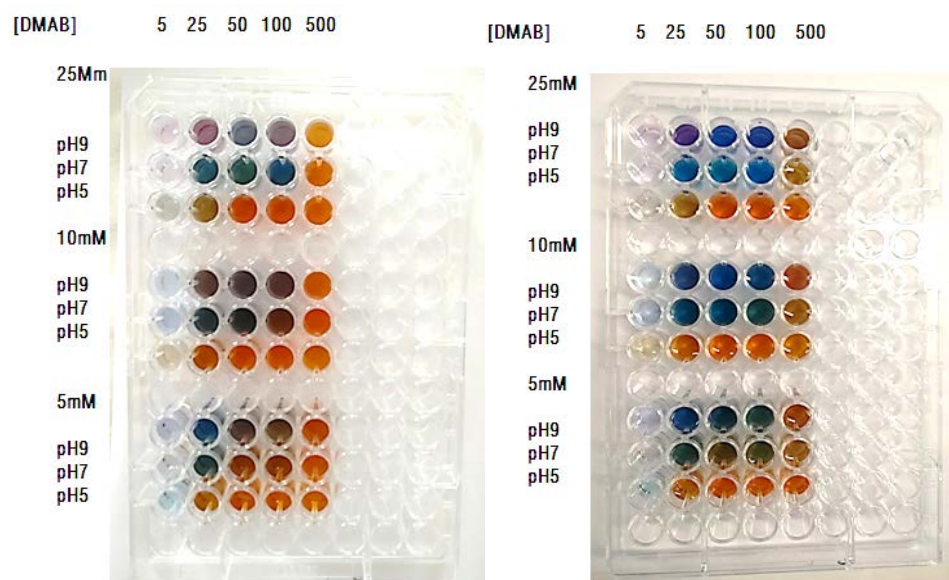


Matriz 2: Izquierda: PAA con AgNO_3 . Para realizar el ajuste de pH se utilizó HCl. Se observa que para las tres concentraciones de PAA, se obtienen colores únicamente en pH base y en neutro a mayor concentración de DMAB. Derecha: PAA con AgNO_3 tras una semana de síntesis.

Se puede observar en la figura anterior que con el paso del tiempo, las muestras siguen presentando color pero las tonalidades sufren cambios hacia colores más azulados (*blue silver*). Se observa que este fenómeno aparece sobre todo en pH básicos. También se aprecia de manera significativa que se producen precipitados. Aunque no se observa una diferencia significativa de comportamiento entre las tres concentraciones de PAA, sí que se puede destacar que el fenómeno de *blue silver* no es tan intenso en las concentraciones bajas de polielectrolito y que es la que presenta más precipitados.

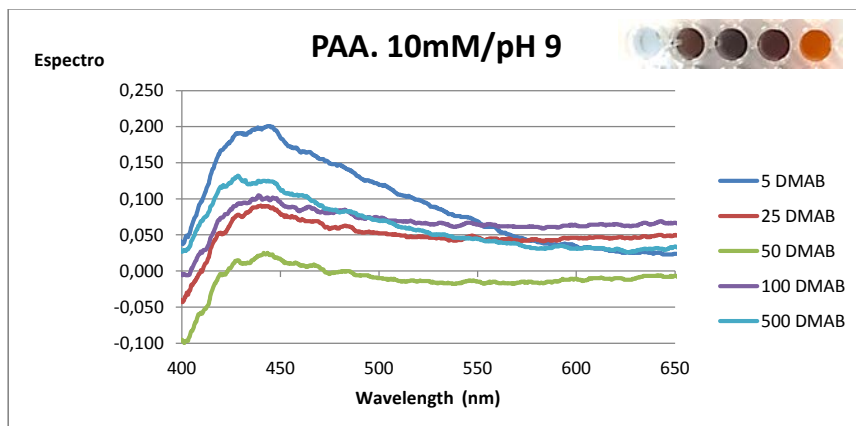
Tras obtener los resultados anteriores se decide repetir el procedimiento con PAA, pero utilizando esta vez HNO_3 para reducir el pH de la disolución, buscando evitar de esta forma que el Ag^+ reaccione con el Cl^- , y se obtenga plata libre para reaccionar con el DMAB, y obtener mayor diversidad de coloración debido al efecto de la reducción de Ag^+ .

A continuación se muestran los resultados obtenidos, que respaldan la teoría anteriormente enunciada, ya que como se puede observar, se obtiene coloración para los tres pH y además el rango de tonalidades es mucho más diverso: verdes, violetas, azules. En este caso, también se comprueba que con el paso del tiempo la coloración va cambiando y se produce también el fenómeno del *blue silver*.

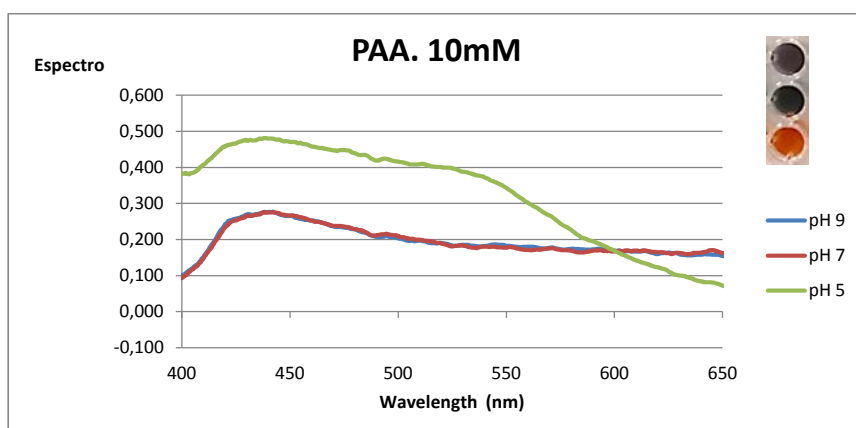


Matriz 3: Izquierda: Matriz de PAA con AgNO_3 con pH ajustado con HNO_3 . Se realiza con el proceso de síntesis 3, pero se utiliza HNO_3 para reducir el pH y evitar que el Cloro presente en el HCl pueda consumir la plata catiónica. Derecha: la misma matriz de síntesis tras una semana de envejecimiento en condiciones normales de laboratorio. Se puede observar su gran estabilidad.

En la figura anterior se muestra claramente que para pequeñas concentraciones de DMAB ($5\mu\text{L}$) se puede observar casi de manera instantánea las reacciones secundarias llamadas blue silver, obteniendo tonos azulados y violetas. A diferencia del procedimiento anterior, se obtienen colores con los tres pH, para pH ácidos se observan colores naranjas mientras que para pH básicos los tonos son más azulados y verdosos. En la misma figura a la derecha se muestra la misma matriz de PAA con AgNO_3 reducida con HNO_3 una semana después de su síntesis. Como se puede observar, el fenómeno llamado blue silver es ahora más apreciable en pH bases y neutros, se observan también colores verdosos en pH7 con concentraciones 10mM y 5mM de PAA, también se observa que en pH5 el color anaranjado se mantiene. Además aparecen también tonos violetas con la mayor concentración de polielectrolito. (25mM).



Gráfica 1: Esta grafica representa la evolución en horizontal de la fila de la matriz de síntesis de concentración 10mM a pH 9, lo que varía es la concentración de DMAB. Se puede observar que a menor concentración de DMAB el pico característico de la plata presenta mayor absorbancia. Los datos corresponden a las muestras antes de presentar el fenómeno de blue silver, que provoca un cambio no solo de color sino también en el espectro.

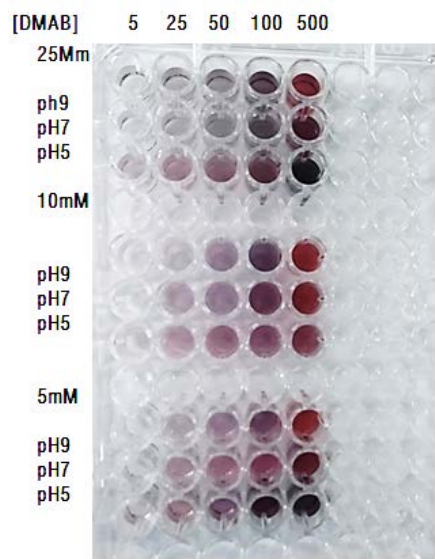


Gráfica 2: En esta gráfica se muestra la influencia del pH en las muestras sintetizadas. Las muestras corresponden a la misma concentración de PAA (10mM) y de DMAB (50µL) a diferentes pH. Se puede observar que la diferencia entre pH 9 y pH 7 no es significativa, visualmente se puede ver en la matriz 4 que estos pH presentan unas tonalidades parecidas. A pH 5 se obtiene un espectro con una absorbancia menor y visualmente se comprueba que los colores que aparecen son diferentes y más anaranjados.

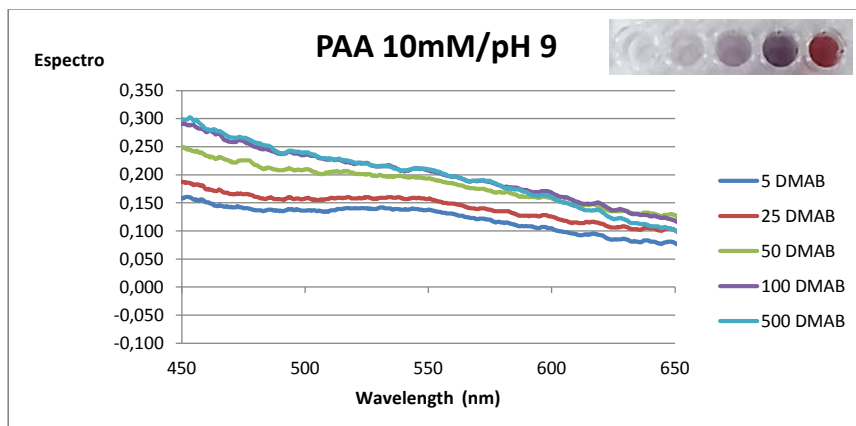
Estudio de distintos agentes encapsulantes

Se repite el mismo proceso de síntesis pero esta vez se utiliza el agente precursor del oro (HAuCl_4) para obtener de esta forma la matriz de colores de nanopartículas de oro. El oro es un elemento que presenta mayor estabilidad, lo que implica que el paso del tiempo no influye tanto como en la plata. Por esta razón, se incluye únicamente una matriz de síntesis, ya que no se observan cambios de color con el tiempo.

A diferencia del procedimiento anterior con plata, donde se observa una paleta de colores más variada (azul, verde, amarillos), con el precursor de oro se espera obtener tonos violetas y rojos con diferentes intensidades.



Matriz 4: PAA (HAuCl_4). Se observa que se obtiene la misma paleta de colores para las tres concentraciones de PAA con las que se trabaja, aunque se puede apreciar algo más de intensidad de los colores a mayor concentración. Con bajas concentraciones de DMAB, se obtiene tonalidades violetas o moradas poco intensas y conforme se aumenta la misma, se obtiene un color conocido como *red wine*.



Gráfica 3: Evolución horizontal de las muestras [PAA]=10mM a pH9 según aumenta la concentración de DMAB. El pico característico del oro se presenta en torno a 510nm en todas las muestras, la absorbancia aumenta con la [DMAB], conforme el color se vuelve más intenso.

4.2.2. Síntesis con PAH.

AgNO₃.

Como ya se ha indicado anteriormente, se va a realizar el proceso de síntesis 3, pero en este caso se va a probar con otros polielectrolitos. Un factor importante a tener en cuenta es el pH primitivo de los mismos, y en el caso de necesitar reducir a pH más ácidos se utiliza ácido nítrico (HNO₃) en vez HCl, para evitar que AgCl precipite, como se ha explicado en apartados anteriores.

Se realiza el procedimiento con PAH, polyelectrolito débil con carácter catiónico (+). El procedimiento de síntesis así como las concentraciones utilizadas son las mismas que para el PAA.

Primero se prepara una disolución de 200mL con una concentración [PAH] = 25mM, a raíz de esta disolución madre, se obtienen otras dos de 100mL cada una con [PAH]= 10mM y [PAH]= 5mM.

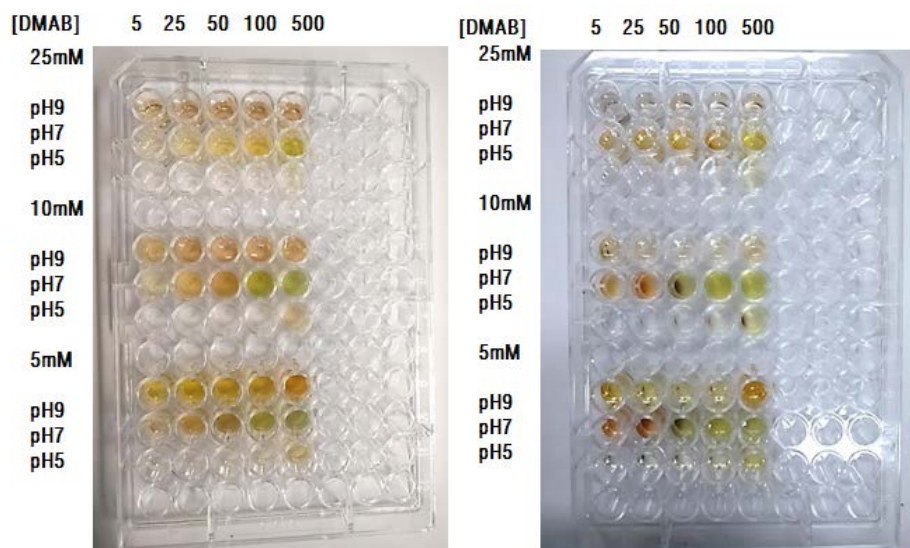
En cada una de ellas se realiza una medición del pH primitivo, el polielectrolito PAH presenta un pH primitivo en torno a 4.5, lo que en este caso supone una ventaja ya que no se va a necesitar reducir el pH a valores más ácidos, únicamente a pH básicos, que se realiza con la adición de NaOH, proceso que por el momento no ha presentado problemas.

Se separan muestras (25mL) de pH ácido, neutro y base, como ya se ha explicado anteriormente. En estas muestras se añaden 200μL de AgNO₃ y se deja agitar. Una vez las muestras estén bien agitadas se aprecia que se ha producido un pequeño cambio de tono y se observa un color amarillento, con más intensidad en las muestras de [PAH]= 5mM y pH 9.

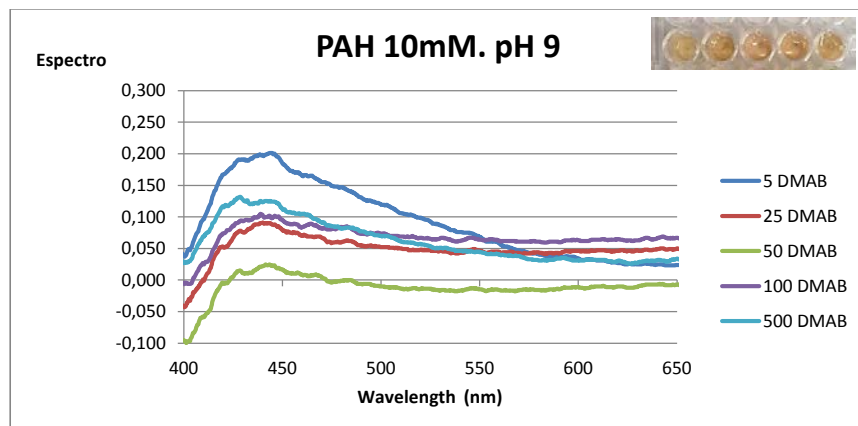
Estudio de distintos agentes encapsulantes

Se procede a realizar la separación de las mismas en muestras de 5mL para a continuación realizar la adición de DMAB en 5 concentraciones diferentes. Un vez se consideran estabilizadas las muestras se pueden observar diferentes tonalidades que se reflejan en la siguiente Matriz 5

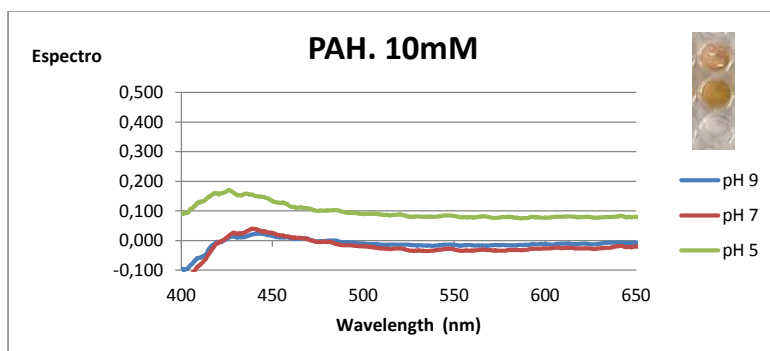
A diferencia de la matriz obtenida para PAA, se obtienen colores más intensos con menor concentración de polielectrolito [5mM]. Los tonos que se observan a pH 7 son más verdoso con altas concentraciones de DMAB y más amarillentos con menores. Además las muestras con pH9 presentan tonos más rojizos o marrones. Al igual que con la matriz de PAA, para pH5 no se aprecian cambios de color significativos. Esto puede ser una prueba de la teoría de que el DMAB no reacciona con pH muy ácidos.



Matriz 5: a) Matriz de colores PAH con AgNO₃, se obtienen colores amarillentos y anaranjados, se observa que para pH neutros con mayor concentración de agente reductor DMAB (100 y 500µl) se obtiene un tono más verdoso. Con pH9 se obtiene una coloración anaranjada menos intensa a mayor concentración de PAH. Para pH ácidos prácticamente no se aprecia coloración. Por tanto, el PAH no reacciona como se esperaba con el DMAB para pH 5. b) PAH con AgNO₃ tras varios días después de la síntesis. Se observa pérdida de color en las muestras de pH 9 y en general pérdida de intensidad de las tonalidades. Para pH neutro se observa un ligero cambio de color a tonos más verdoso. Además destaca la aparición de precipitados, más significativos en las muestras con una concentración de DMAB media y en las concentraciones más bajas de polielectrolito.



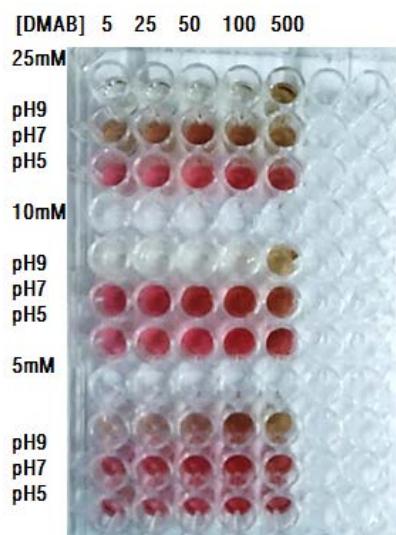
Gráfica 4: Esta gráfica representa la evolución horizontal de la fila de [PAH]=10mM y pH 9. Se observa como el pico con mayor absorbancia corresponde con la concentración más baja de DMAB. También cabe destacar que la muestra con un pico más bajo corresponde con la concentración de DMAB de 50µL, esta muestra es la que presenta precipitados con el paso del tiempo y por tanto, es la menos estable.



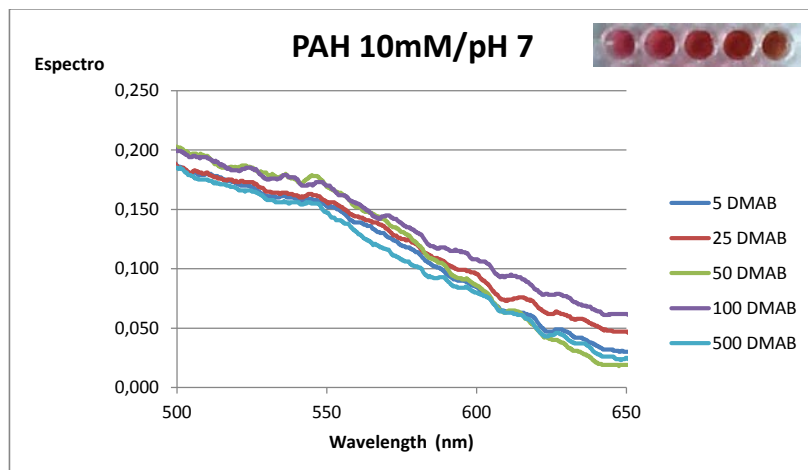
Gráfica 5: Esta gráfica representa la influencia del pH en las diferentes muestras de [PAH]=10Mm y [DMAB]= 50µL. SE puede observar que para pH básico y neutro las muestras se comportan de manera parecida y no se observa una diferencia significativa. Sin embargo, para pH5 el comportamiento es diferente, visualmente se comprueba esta diferencia, como ya se ha indicado anteriormente para pH ácidos no se obtiene prácticamente color. Se demuestra por tanto, la influencia del pH en la síntesis a la hora de buscar resultados específicos.

HAuCl₄.

A continuación, se realiza el mismo procedimiento con el precursor de partículas de oro.



Matriz 6: Matriz de colores con PAH y HAuCl₄. A diferencia que al utilizar el precursor de plata. Las tonalidades son más intensas a menor concentración de polielectrolito (5mM), fenómeno que también se observaba en su matriz homóloga para la plata, Matriz 5. También cabe destacar que se obtienen más colores con las muestras de pH ácidos, ya que como se puede apreciar en la imagen, las de pH 9 casi no presentan coloración excepto para elevadas concentraciones de DMAB, donde poseen tonalidades marrones. Para [PAH]=25Mm, se observa un tono amarronado en pH7 y el tono rojizo esperado aparece en pH5.



Gráfica 6: Evolución del espectro de la fila horizontal en la matriz de síntesis de PAH con oro, según aumenta la concentración de DMAB. En este caso se ha tomado la fila [PAH]=10mM a pH7 ya que posee colores más representativos. Como se observa claramente el espectro prácticamente no presenta diferencias, ya que como se demuestra visualmente (Matriz 11), el color rojizo característico del oro se mantiene en toda la fila.

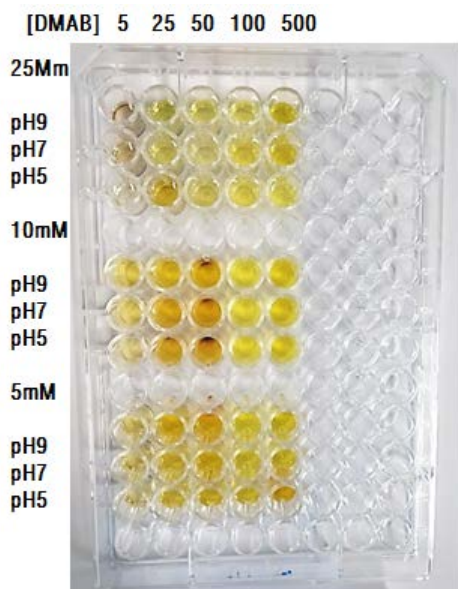
4.2.3. Síntesis con PSS.

AgNO₃.

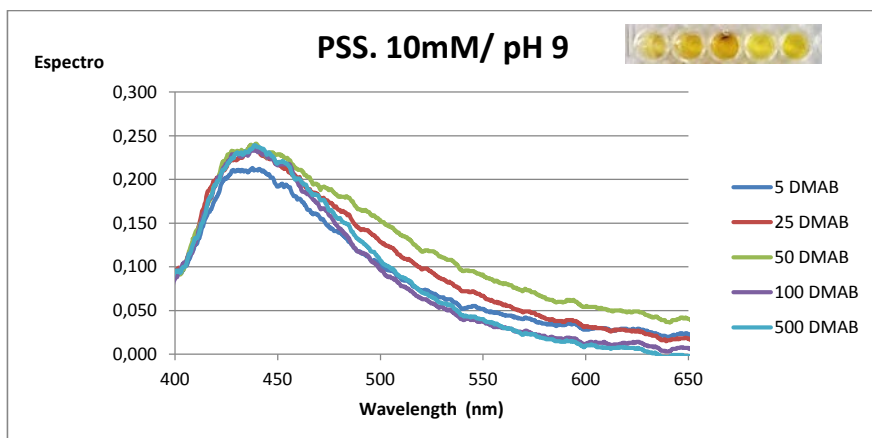
Se repite el mismo procedimiento para PSS, en este caso se tiene un pH primitivo en torno al 6.5, por tanto la adición de un compuesto capaz de aumentar la acidez de la disolución es necesaria. Se utiliza HNO₃ para esta tarea.

Una vez se realiza la adición del AgNO₃, se observa que las disoluciones toman un tono violeta. Más intenso en las concentraciones más altas de PSS, y no se aprecia una diferencia muy significativa entre pH. Una vez se añade el agente reductor, se observan tonalidades amarillentas.

El PSS es un polielectrolito fuerte y debido a esta característica no se aprecian diferencias significativas entre pH ni concentraciones de DMAB. Una observación destacable es que se obtiene el color más intenso con la concentración de DMAB = 25µl y que con el paso del tiempo es el único que presenta precipitados, este fenómeno sobretodos se observa para [PSS]=10Mm.



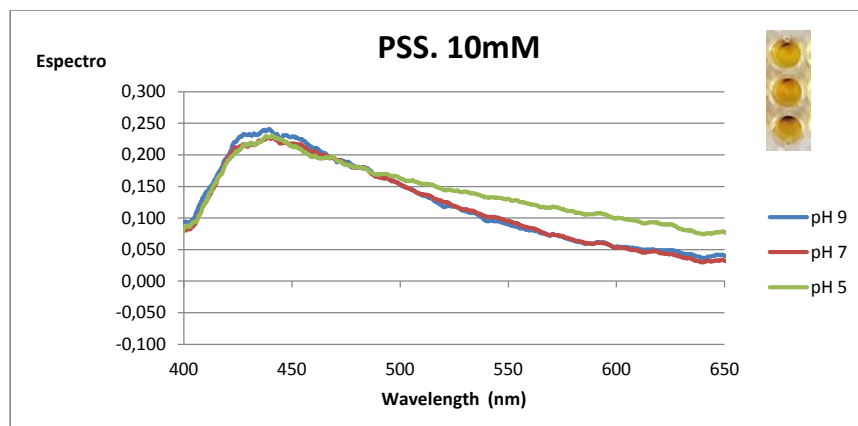
Matriz 7: Matriz de colores con PSS con AgNO_3 , al tratarse de un polielectrolito muy estable no se aprecia prácticamente diferencias entre concentraciones. Esto hace que tampoco se observe un cambio muy significativo a con el paso de tiempo y por ello no se considera necesario incluir la diferencia. La única característica que se aprecia con el paso del tiempo desde la síntesis, es que las muestras de mayor concentración tienden a perder la coloración más rápido y que la mejor se mantiene corresponde a la concentración intermedia 10mM. Se observa que esas mismas muestras son las que presentan precipitados con el paso del tiempo.



Gráfica 7: En esta gráfica se representa la evolución horizontal de las muestras de $[\text{PSS}]=10\text{mM}$ a pH 9 conforme se aumenta la concentración de DMAB. Se observa claramente que se trata de un polielectrolito fuerte y el más estable hasta ahora analizado, ya que

Estudio de distintos agentes encapsulantes

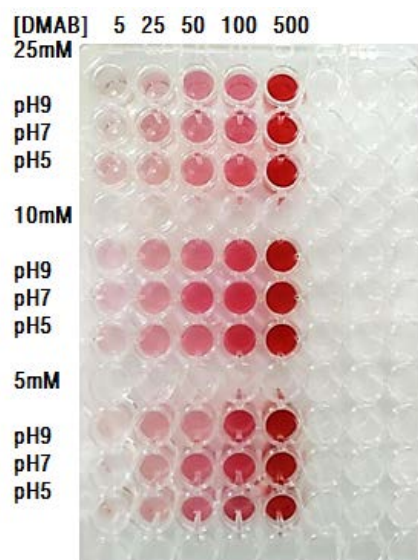
no se aprecian diferencias muy significativas en los espectros según la [DMAB]. El pico característico se mantiene en la misma longitud de onda y con valores de absorbencia similares.



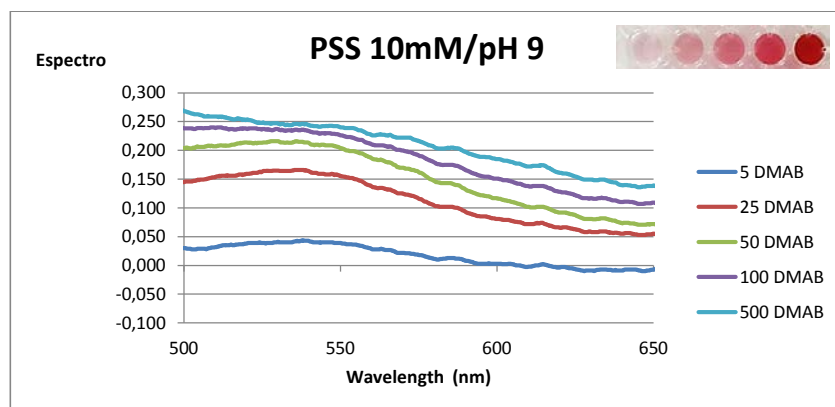
Gráfica 8: Esta gráfica representa la influencia del pH en la síntesis de las partículas. Se comprueba que el PSS es un polielectrolito muy estable y a diferencia que en los anteriores, el comportamiento no se ve modificado de manera significativa con el pH, como se comprueba visualmente en la matriz de síntesis donde no hay cambios de tonalidades apreciables.

HAuCl₄

Como con los otros agentes encapsulantes, el proceso se repite utilizando HAuCl₄ como precursor para sintetizar partículas de oro.



Matriz 8: Matriz colores con PSS y HAuCl_4 . Como ya se ha indicado se trabaja con un compuesto muy estable y por esta razón se obtiene los mismo resultados para diferentes concentraciones y pH. Se obtiene una matriz con la aparición de color de forma gradual conforme aumenta la concentración de DMAB, de un rosa claro a red wine.



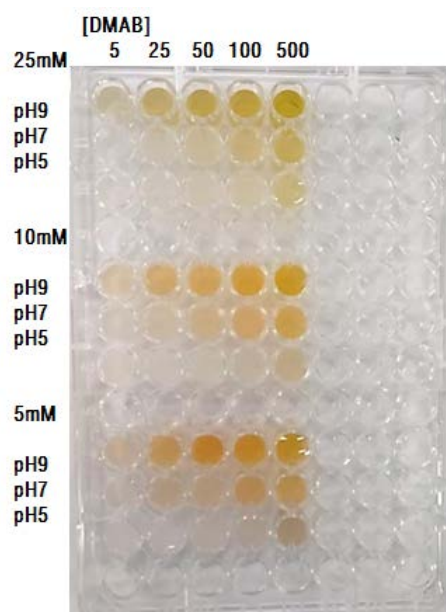
Gráfica 9: Evolución de la fila de la matriz de síntesis de $[\text{PSS}]=10\text{mM}$ a pH9 con HAuCl_4 según aumenta la concentración de DMAB. Se observa claramente que a mayor concentración de agente reductor aumenta la intensidad del color de la muestra y por tanto, la absorbancia del pico característico del oro.

4.2.4. Síntesis con PDDA.

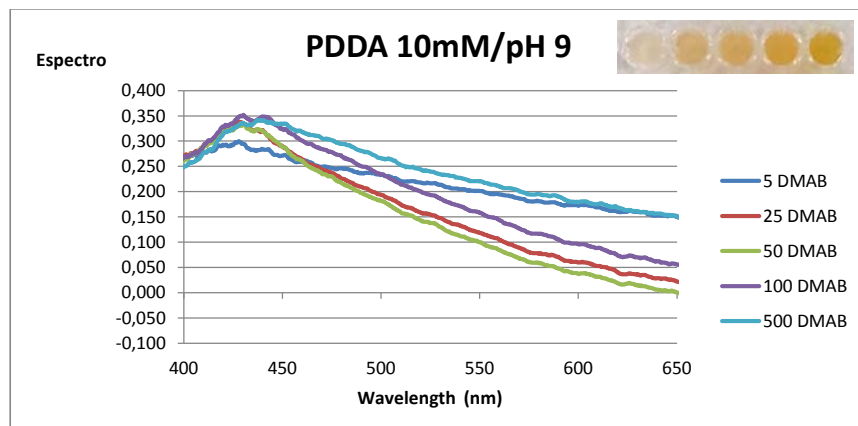
AgNO_3 .

Estudio de distintos agentes encapsulantes

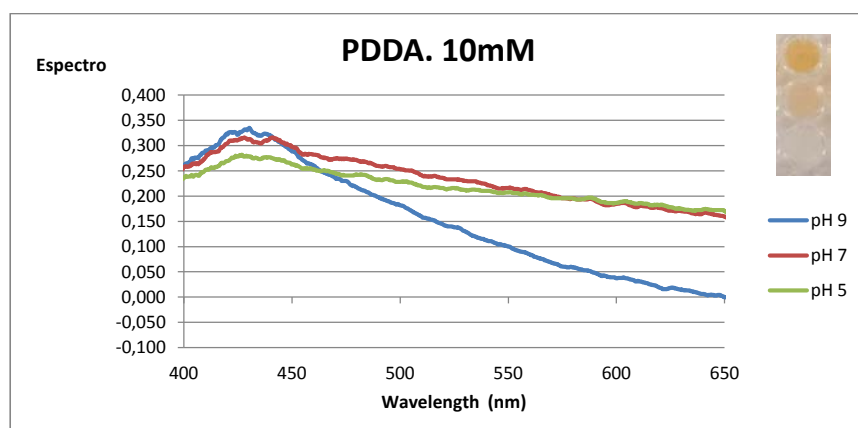
Para finalizar con la obtención de las diferentes matrices de colores, se repite el procedimiento con PDDA, polielectrolito fuerte con carga positiva. A continuación se analiza la matriz de síntesis obtenida con AgNO_3 .



Matriz 9: Matriz de colores para PDDA con AgNO_3 , se observan los colores más interesantes con pH base y con la mayor concentración de agente reductor DMAB. Al igual que pasaba con PAH, se observa que para el estudio que se está realizando, el PDDA con pH ácido no aporta una gama de colores tan diversa, y los colores se obtiene principalmente para pH7 y pH 9. A menor concentración de PDDA, se obtienen tonalidades más anaranjadas, sin embargo para la concentración de 25mM, se tienen colores más verdosos. Con el paso del tiempo no se observan cambios significativos en las tonalidades.



Gráfica 10: En esta gráfica se representa la evolución horizontal de las muestras [PDDA]=10mM a pH 9 conforme se aumenta la concentración de agente reductor. Visualmente no se aprecia un cambio de color muy significativo ya que toda la fila posee tonalidades anaranjadas, esto se comprueba en que los espectros que se obtienen son similares.

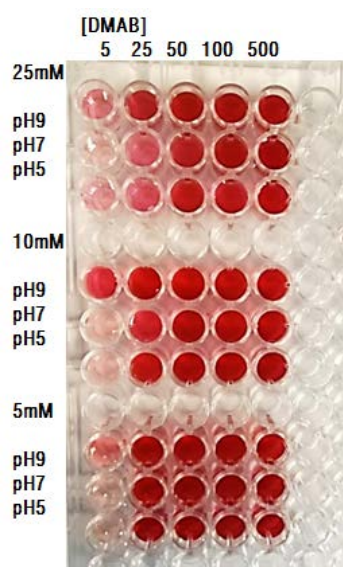


Gráfica 11: En la gráfica se muestra la influencia del pH en la síntesis. A diferencia del PSS, analizado en el apartado anterior sí que se observa diferente comportamiento de las muestras según el pH. El pico se mantiene en la misma longitud de onda aunque la absorbancia y la caída del espectro después sí que se ven modificados. Con ácido y neutro el comportamiento es similar, ambas muestra presentan un color blanquecino. Sin embargo, con pH9 la caída es mucho más brusca. En este pH se posee un color anaranjado más vistoso e intenso.

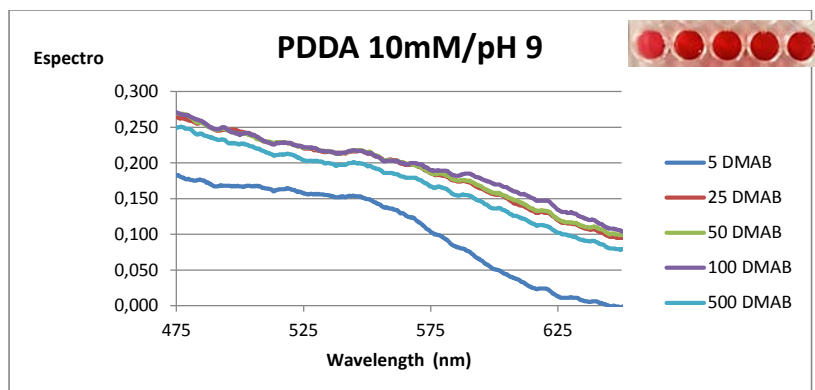
Estudio de distintos agentes encapsulantes

HAuCl₄

Se repite el proceso con partículas de oro.



Matriz 10: Matriz de colores PDDA con HAuCl₄. Se observa que prácticamente no cambia la coloración red wine, a partir de la concentración de 25µl de DMAB. Para menores concentraciones del agente reductor se observan coloraciones con poca intensidad, aunque se aprecia que el pH 9 es más propenso a tomar coloración en este rango.



Gráfica 12: Evolución de la muestras [PDDA]=10Mm A pH 9 según aumenta la concentración de DMAB. Se observa que prácticamente todas las muestras presentan el mismo espectro, y visualmente se comprueba que poseen el mismo color. La muestra más diferente corresponde con la menor [DMAB] como cabía esperar ya que la concentración de agente reductor es muy poca y la reacción es débil en esas proporciones.

4.3. Conclusiones de la síntesis de nanopartículas.

En esta primera parte del proceso se han obtenido 8 matrices de colores, 2 para cada polielectrolito, una con partículas de plata y otra con las partículas de oro. Aunque, como ya se ha indicado, se puede apreciar visualmente las diferencias entre las diferentes síntesis, se quiere realizar un análisis exhaustivo de las partículas obtenidas para poder realizar posteriormente una aplicación a nivel ingenieril. Por esta razón se han incluido diferentes gráficas que muestren los espectros de las muestras que se consideran más significativas.

Para realizar este estudio se utiliza el fenómeno del LSPR. Explicado de manera detallada en el primer apartado del proyecto. Para la caracterización óptica de estos espectros se recogen los datos de absorbancia desde 350 a 900nm en un espectrómetro UV-Vis. Al principio del proceso se contaba con un número elevado de muestras, cada matriz de síntesis posee 45 muestras y se obtienen 8 matrices, lo que supone realizar 360 mediciones. Realizar todas las mediciones con un espectrómetro suponía una inversión de tiempo importante. Por esta razón se decide realizar la toma de medidas con el montaje, explicado anteriormente, que funciona como espectrómetro permitiendo realizar un barrido de todas las muestras de manera más rápida. La realización de las mediciones de esta manera queda justificada debido a que aunque se perdió precisión en estas primeras mediciones, se facilitó el proceso de selección de las muestras que realmente interesan para continuar el proyecto. Para la realización del resto de mediciones, donde se buscaba mayor precisión, se utilizó un espectrómetro modelo Jasco V-630. Todas las mediciones se realizaron a temperatura ambiente.

Las nanopartículas con las que se va a trabajar poseen fundamentalmente forma esférica por lo que se espera que su espectro presente un único pico de resonancia. En función del tipo de partícula sintetizada (plata u oro) este pico aparecerá a diferentes longitudes de onda.

Cuando se trabaja con nanopartículas esféricas de plata, que generalmente, como se ha observado en los apartados anteriores, presentan tonalidades amarillas y naranjas, poseen el pico de resonancia en torno a 410 nm, si se produce algún aglomerado el pico resultante es más ancho y está un poco desplazado a la derecha (>410nm). Un caso particular son las partículas de plata que sufren el fenómeno de *blue silver*, que presentan un color azulado y su pico de resonancia se encuentra aproximadamente en 600nm. En el caso del oro, las partículas de morfología esférica presentan colores rojizos, que poseen su pico de resonancia característico en torno a 520nm.

Una vez especificados los procedimientos se realiza un barrido general de todas las muestras obtenidas para obtener sus espectros y observar si los resultados obtenidos se corresponden con los esperados. Como se ha indicado anteriormente, las muestras amarillas y naranjas de plata presentan su pico en torno a 410nm, las rojizas de oro poseen el pico en torno a 520nm y las azuladas en torno a 600nm.

Como se puede observar en las gráficas del apartado anterior (gráfica 3 y gráfica 6), en algunos espectros los picos no están tan definidos en su longitud de onda característica como cabía esperar. Estas muestras presentan picos de absorción desplazados, más anchos o no tan definidos. Esto puede deberse a:

1. En la síntesis se han obtenido partículas con morfología diferente a la esférica, como se esperaba inicialmente. Como ya se ha explicado anteriormente, las esferas presentan únicamente un pico, ya que

Estudio de distintos agentes encapsulantes

poseen solo una dirección de crecimiento. Sin embargo, existen otras nanoestructuras que poseen más picos, ya que pueden crecer también en dirección longitudinal.

2. Se ha podido producir una aglomeración de partículas y la aparición de diferentes picos se debe a varias partículas esféricas juntas. Este fenómeno se debe a la dependencia del grado de ionización de los polielectrolitos y el pH. Este fenómeno depende del tipo del agente encapsulante con el que se esté trabajando. Se va a explicar el efecto con el PAA, polielectrolito negativo con carácter débil.

A menor grado de ionización (menor pH de la muestra) el polielectrolito se encuentra más aglomerado y enredado, lo que provoca que las partículas crezcan más juntas y enredadas unas con otras, lo que puede provocar que se solapen los picos. En caso de tener este fenómeno, los picos que se observan no se corresponden con partículas que puedan crecer en varias direcciones, sino la superposición de los diferentes pico de partículas esferoidales de diferente tamaño que se presentan aglomeradas.

En el caso contrario, a mayor grado de ionización (mayor pH). El polielectrolito crece de forma lineal, lo que facilita que las partículas crezcan más separadas.

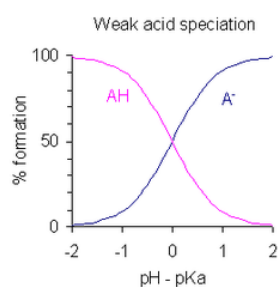


Ilustración 5: Gráfica que relaciona el grado de ionización y el pH, para polielectrolitos de carácter débil. El PAA posee carácter negativo, por lo que a pH ácidos crecerá de forma aglutinada. El PAH presentará el comportamiento contrario, por lo que en pH base, crecerá de manera más aglomerada.

La segunda teoría tomó más fuerza a medida que se fue analizando todos los espectros y, finalmente, se corroboró con las pruebas TEM, que se explicará detalladamente más adelante. Como se ve en la imagen las partículas de oro en las muestras de color violeta presentan morfología esférica pero se encuentran aglomeradas, lo que impide la visualización del pico bien definido en las muestras.

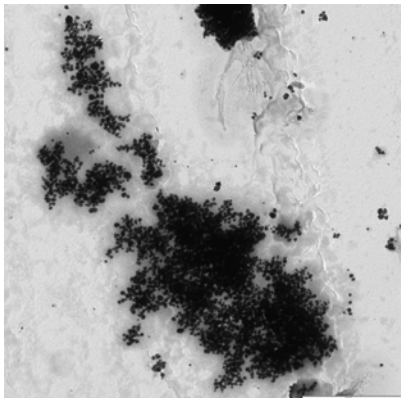


Ilustración 6: Muestra PAA 10Mm a pH 5 con HAuCl_4 de color violeta. Se observan aglomerados de las partículas de oro.

5. Dispersiones combinadas con distintas nanopartículas.

El siguiente paso en el proyecto es conseguir en una misma muestra nanopartículas de oro y plata. Lo que se busca obtener es un espectro en el que se puedan observar ambos picos, el del oro y el de la plata. Esto se busca con el objetivo de realizar posteriormente una aplicación relacionada con sensores, utilizando la estabilidad característica del oro frente a la reactividad de la plata.

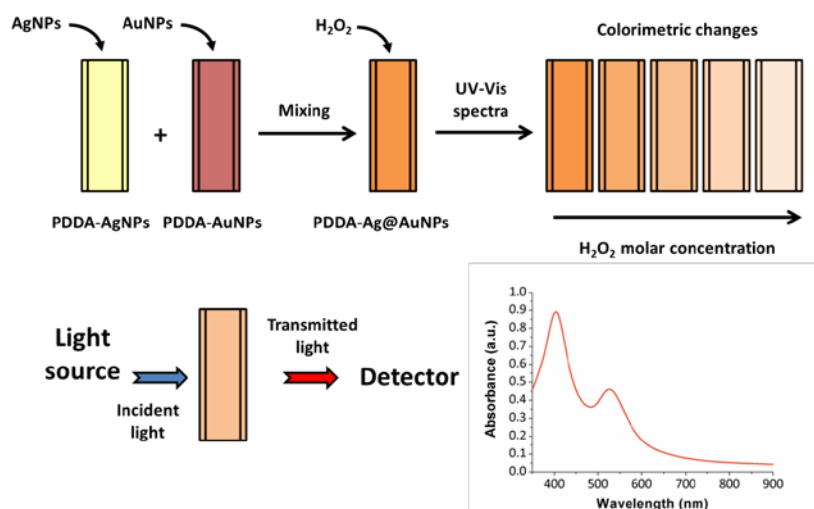


Ilustración 7: Representación esquemática del proceso para la obtención del sensor óptico colorimétrico basado en nanopartículas de oro y plata.

La obtención de la mezcla que cumpla con las características deseadas, parece a priori un proceso sencillo. Sin embargo, en la preparación del mismo se observa la dificultad de ajustar todos los parámetros que entran en juego en la reacción. Se debe tener en cuenta:

- El tiempo que las partículas llevan sintetizadas.
- La proporción de cada muestra.
- Los valores de disolución.
- La compatibilidad de la muestra de oro con la de plata.
- La intensidad de los picos.

Debido a la variedad de factores que entran en juego, esta parte del proyecto necesitó su tiempo y dedicación, lo que conlleva la realización de múltiples pruebas para obtener un resultado considerado óptimo.

Dispersiones combinadas

5.1. Selección del medio encapsulante.

El primer factor que se quiso resolver fue la compatibilidad de ambas muestras. Por esta razón, y para reducir la influencia debida a este factor, se decide realiza la síntesis de las partículas por separado pero utilizando el mismo polielectrolito. De esta forma, se espera que a la hora de realiza la mezcla de los dos tipos de nanopartículas el agente encapsulante no presente problemas adicionales al proceso.

Se busca obtener los dos picos de la forma más clara posible, es decir, que se pueda observar en las muestras ambos picos bien diferenciados en sus longitudes de onda correspondientes, que presenten un pico estrecho y a ser posible, que el pico de la plata posea una absorción mayor que el del oro. Para ello, se realiza un estudio de cuál es el polielectrolito de los cuatro utilizados, que mejor cumple las condiciones para los requerimientos de la prueba.

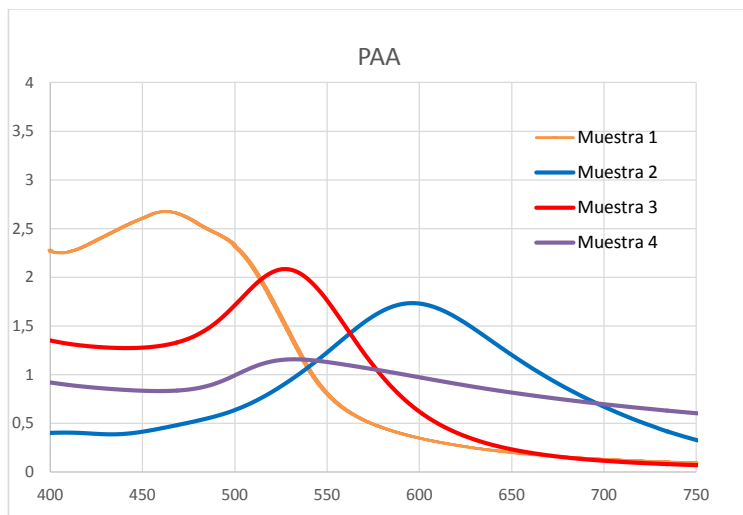
Se selecciona de cada polielectrolito, una o dos muestras de plata y oro (según se considere). Se busca que las muestras de plata posean un color amarillo-anaranjado y las de oro, su característico *red wine*. Se analizan de manera exhaustiva sus espectros por separado y la mezcla de los mismos, tomando la misma proporción de plata y de oro (1mL). Con este ensayo, se busca obtener el polielectrolito que presente de forma más óptima los picos de ambos elementos y seguir el proyecto utilizando ese agente encapsulante.

A continuación se va a realizar una breve explicación de los resultados obtenidos para cada polielectrolito.

5.1.1. PAA:



Ilustración 8: Muestras iniciales PAA. Se trata del encapsulante que mayor variedad de colores presenta y por esta razón se seleccionaron cuatro muestras de partida dos de cada precursor. **1)** AgNO₃ / 25mM / pH5 / 50μL (DMAB) **2)** AgNO₃ / 10mM / pH9 / 50μL (DMAB) **3)** HAuCl₄ / 5mM / pH9 / 500μL (DMAB) **4)** HAuCl₄ / 25mM / pH7 / 100μL (DMAB).



Gráfica 13: La gráfica recoge los espectros correspondientes de las muestras iniciales de PAA. Se observa claramente el cambio de comportamiento debido al fenómeno "blue silver". En la muestra 1 el pico está en 466nm mientras que en la 2, de color azul, aparece en 600. Para las muestras de oro, varía la absorbancia pero el pico aparece en torno a la misma longitud de onda (530nm)

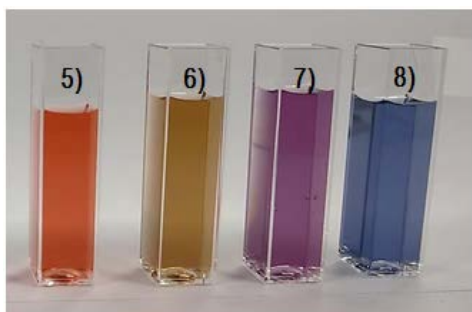
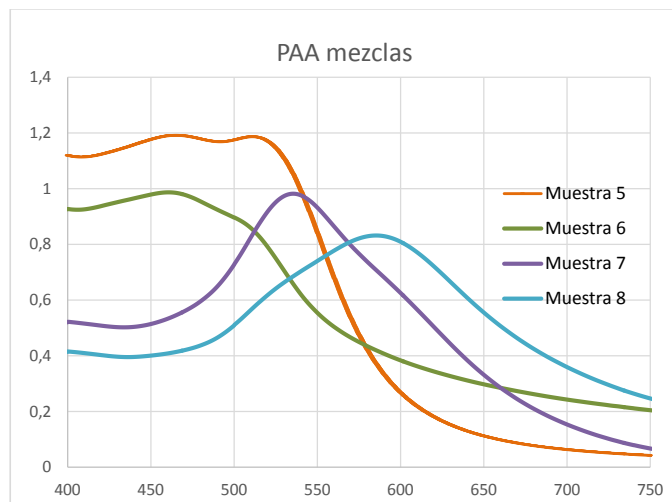


Ilustración 9: Mezclas de nanopartículas de oro y plata con PAA obtenidas a partir de la muestras de la Ilustración 8. 5) Muestra 1 + Muestra 3 6) Muestra 1 + Muestra 4 7) Muestra 2 + Muestra 3 8) Muestra 2 + Muestra 4



Gráfica 14: Representa los espectros de las mezclas. Es el encapsulante que presenta una mayor variedad de colores, por esta razón se seleccionan cuatro muestras de partida, dos de plata (amarillo y azul) y dos de oro (rojo y morado). El objetivo del estudio es comprobar si se puede obtener la visualización de ambos picos en una única muestra. En la muestra 5, correspondiente a la mezcla del amarillo y red wine, se observa una ligera aparición de los dos picos. Por lo tanto, esta combinación podría ser posteriormente utilizada. De todas maneras, la apreciación de los dos picos no es la más óptima, ya que ambos picos están muy juntos y la absorbencia es parecida en los dos. Para obtener los dos picos de la forma que se requiere, se debería de realizar un ajuste complejo en el que entran muchos factores: proporciones, disolución, pH, etc.

Dispersiones combinadas

5.1.2. PAH.

Se comenzó el estudio del PAH de la misma forma que con el PAA. Se hizo una primera selección de las muestras que se consideraban más representativas y se procedió a realizar las mezclas de las mismas. Sin embargo, el comportamiento no fue el deseado y los espectros obtenidos no resultaban de gran utilidad. Se obtuvo un resultado parecido al obtenido en PAA, la localización de los dos picos en las características que se buscan implicaba la realización un ajuste demasiado complejo. A pesar de, a priori, no obtener datos interesantes, esta primera prueba permitió observar diferentes comportamientos según el pH de las muestras de oro. Debido a esto, se decidió realizar una segunda selección de muestra de PAH y un estudio más específico para este encapsulante centrado en la influencia del pH de las muestras.

El objetivo de esta segunda prueba es observar qué influencia tiene el pH, para ello se seleccionan tres muestras de oro con los tres pH con los que se está trabajando y se mezcla por separado con la misma muestra de plata de color anaranjado. A simple vista las tres muestras de oro presentan el color red wine característico del mismo, sin embargo, se busca demostrar que la diferencia de pH influye en la aparición de los dos picos.

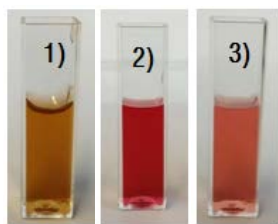
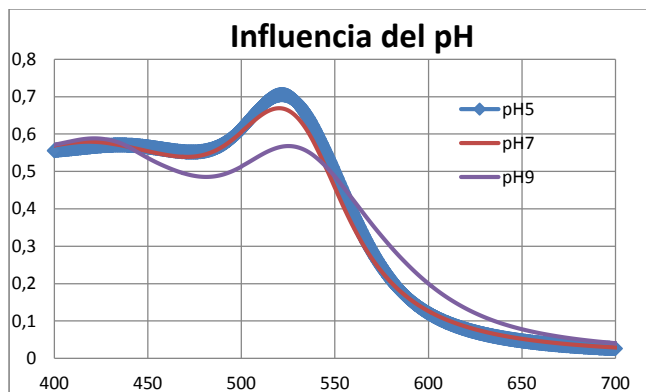


Ilustración 10: 1) AgNO_3 / 5mM / pH9 / 500 μL (DMAB) 2) HAuCl_4 / 10mM / 50 μL (DMAB) 3) Mezcla oro y plata. Las muestras con los tres pH diferentes (5, 7 y 9) presentan el mismo color tanto por separado como en la mezcla.



Gráfica 15: Evolución de las mezclas de oro y plata en función del pH del oro. Como se observa a simple vista al analizar las diferentes gráficas de las mezclas, la aparición de los picos se hace más evidente a pH básico. Como se aprecia en la gráfica, para pH ácidos, el pico del oro predomina frente al de la plata y no se obtiene un pico demasiado definido, sino que únicamente se aprecia una chepa en torno a la longitud de onda correspondiente. Conforme el pH es más básico, se observa como varía el comportamiento de la muestra y ambos picos se definen y distancian obteniendo un espectro algo más parecido a lo que se busca.

Los dos picos se observan de manera más clara en la muestra de pH9 que en las de medios más ácidos. Se llega por tanto, a la conclusión de que el pH de las muestras sí es un parámetro influyente en la síntesis. A la hora de realizar las muestras definitivas para la aplicación se deberá tener en cuenta el pH utilizado.

Dispersiones combinadas

5.1.3. PSS.

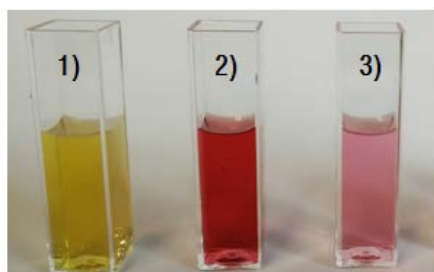
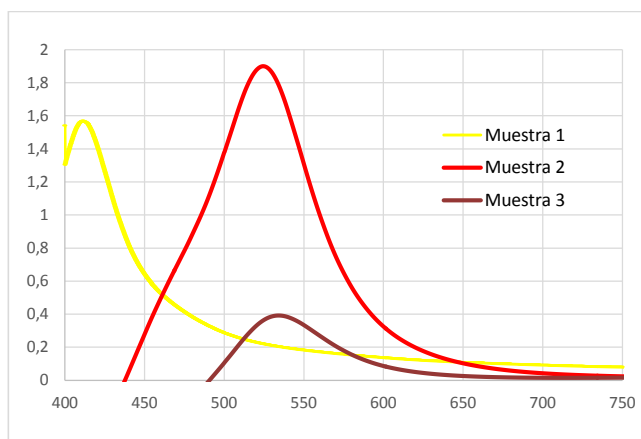


Ilustración 11: Muestra PSS. En el estudio inicial este polielectrolito resultaba el más estable. En la matriz de colores obtenida no se apreciaba una gran paleta de colores. Sin embargo, se decide tomar dos muestras de oro ya que sí que se diferencia dos tonos: red wine y rosado. Como se comprueba en la imagen, esta ligera diferencia afecta de manera significativa en el color final de las mezclas.

1) AgNO_3 / 10mM / pH9 / 50 μL (DMAB) 2) HAuCl_4 / 25mM / pH9/ 500 μL (DMAB) 3) HAuCl_4 / 25mM / pH5/ 100 μL (DMAB)



Gráfica 16: Espectro de las muestras iniciales de PSS. Se observan claramente los picos característicos de cada elemento bien definidos. El de la plata en 416nm y el del oro en 530nm. La gráfica muestra algún espectro de absorción que muestra algunos valores de absorbancia negativos, lo que indica un desajuste en esa región de la medida de la referencia. No obstante, se han incluido ya que la parte significativa correspondiente a los máximos de absorción LSPR están correctamente situados.

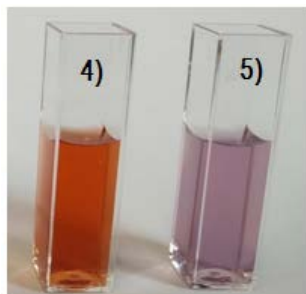
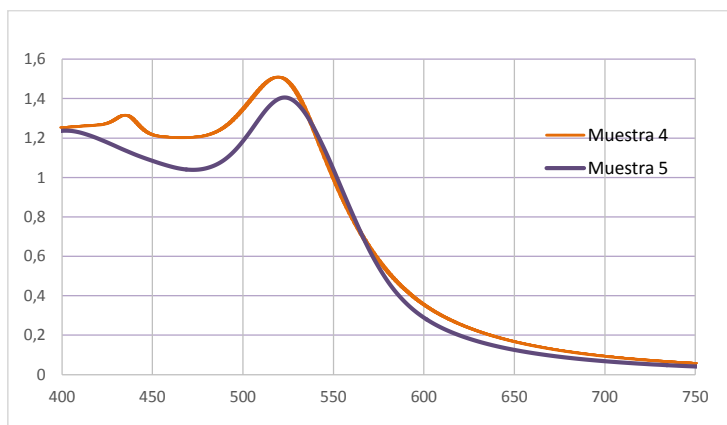


Ilustración 12: 4) Muestra 1 + Muestra 2. 5) Muestra 1 + muestra 3



Gráfica 17: En el caso del PSS, el comportamiento de las mezclas sí que presenta un espectro parecido al que se busca. Ambos picos se ven bien definidos y distanciados. Unos de los requerimientos iniciales es que se busca que la absorbencia sea mayor para el pico de la plata que para el del oro y en las pruebas realizadas el comportamiento es a la inversa. Es una característica importante, sin embargo, se considera que se puede modificar la mezcla para obtener las características deseadas de manera más sencilla que en los casos anteriores y por tanto, se considera mejor opción que el PAA y el PAH.

5.1.4. PDDA

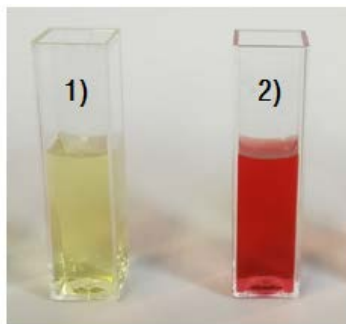
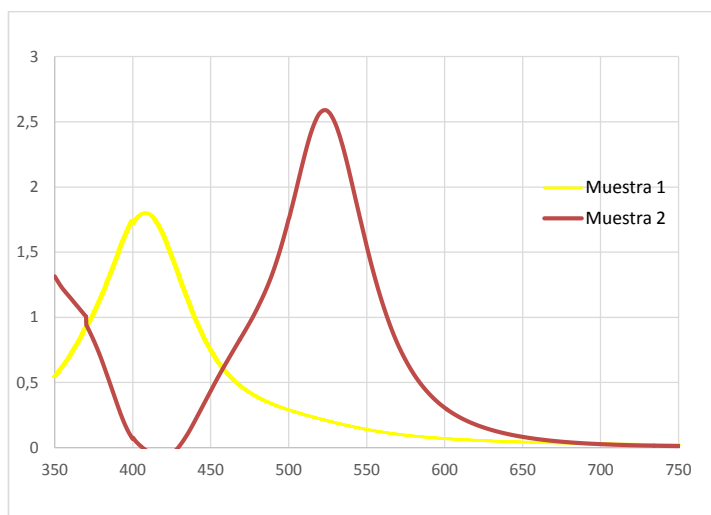


Ilustración 13: Muestras PDDA. 1) AgNO_3 / 25mM / pH9 / 500 μL (DMAB) 2) HAuCl_4 / 5mM / pH7/ 25 μL (DMAB)



Gráfica 18: Se observan de manera muy clara los picos característicos de cada elemento. El de la plata se encuentra en 415nm y el del oro en 527nm. Al igual que en la Gráfica 16 la característica UV-VIS de la dispersión de AuNPs muestra algunos valores de absorbancia negativos, lo que indica un desajuste en esa región de la medida de la referencia. No obstante, se han incluido ya que la parte significativa correspondiente al máximo de absorción LSPR está correctamente situado.

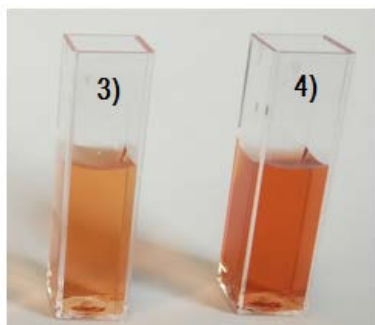
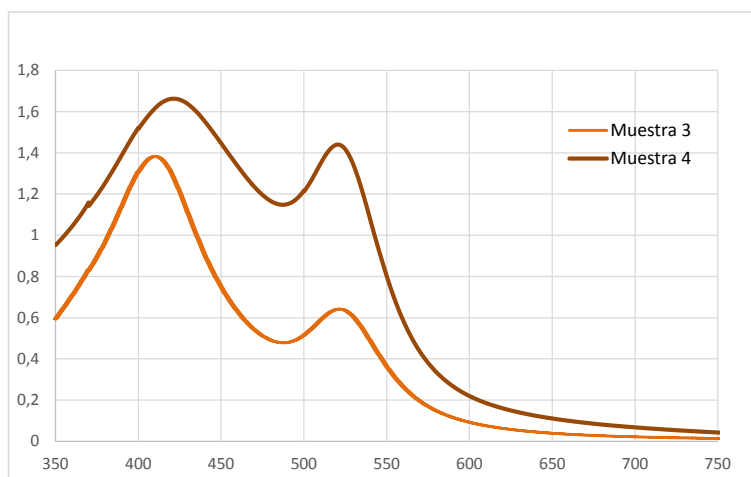


Ilustración 14: Imagen de las tonalidades que presenta la mezcla de oro y plata con PDDA, la segunda muestra corresponde a la misma mezcla pero con un pH ácido, ya que se quiere comprobar su influencia en el comportamiento final. No se ha considerado poner el espectro de las muestra de plata con diferente pH ya que no presenta diferencias significativas.



Gráfica 19: El PDDA presenta las mejores características de los estudios realizados a los cuatro polielectrolitos con los que se está trabajando. En las mezclas se obtienen los dos picos perfectamente diferenciados y definidos. Como se puede observar, el pico correspondiente a la plata se obtiene con una absorbancia mayor, requisito que el PSS no cumplía de manera tan evidente. Se corrobora la hipótesis propuesta en el análisis del PAH sobre la influencia del pH en la aparición de los dos picos. Con pH básico se posee todas las necesidades requeridas para la aplicación colorimétrica que se busca obtener.

6. Sensibilidad de las muestras.

Todas las pruebas y procedimientos realizados anteriormente tienen su fundamento principal en la obtención de un sensor colorimétrico, es decir, la posibilidad de tener una muestra con un color determinado, y que al contacto con una sustancia específica se produzca un cambio de color. Esto permite la posibilidad de tener un sensor que se puede interpretar a simple vista y con capacidad de reacción instantánea, sin necesidad de utilizar otros instrumentos para interpretar los resultados.

Como ya se ha comprobado en los apartados anteriores, la síntesis de nanopartículas de oro y plata da la posibilidad de obtener disoluciones de colores. Se ha realizado un estudio exhaustivo cambiando la concentración tanto del polielectrolito como del agente reductor para obtener así toda la paleta de colores posibles. Se trabaja con los dos tipos de nanopartículas para conseguir que la disolución sea sensible ante agentes externos. Mientras que las partículas de oro son generalmente más estables, las de plata destacan por su alta reactividad. Por esta razón, se utilizan ambos elementos en la mezcla, de esta forma se busca que el oro actúe como referencia, sin sufrir modificaciones en contacto con un agente externo, y sea la plata la que reaccione y provoque el cambio de color.

Como ya se ha indicado en apartados anteriores, lo que se busca es que en los espectros se visualizan los dos picos característicos bien definidos y diferenciados. A su vez, se desea que el pico correspondiente a la plata presente mayor absorbancia que el del oro, de esta forma, se busca observar de manera más clara el efecto del agente en el espectro.

Tras realizar una intensa búsqueda sobre la reactividad de la plata ante diferentes agentes externos, se decide seleccionar el Peróxido de Hidrógeno (H_2O_2) como agente para la aplicación en desarrollo. El agua oxigenada es una especie altamente oxidante.

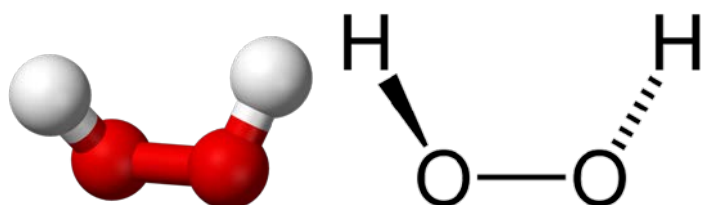


Ilustración 15: Estructura química del Peróxido de Hidrógeno (H_2O_2)

El Peróxido de Hidrógeno es una sustancia producida por el propio cuerpo humano de forma natural. El nivel de H_2O_2 en sangre debe ser mantenido en un nivel constante, ya que ayuda a la producción de estrógenos, progesterona, y tiroxina. Su función principal es mantener el balance oxidativo ácido/alcalino, que determina en gran parte estados de salud o enfermedad dentro de un sistema orgánico vivo. El doctor Otto Warburg (Premio Nobel en 1931) realizó un estudio en el que se comprobaba que la mayoría de las enfermedades son ocasionadas por niveles insuficientes de oxígeno en el cuerpo. Por ejemplo, se demostró que esta falta de oxígeno puede favorecer la aparición y proliferación de células cancerosas, ya que si se priva a una célula del 35% de su nivel necesario de oxígeno durante 48 horas puede volverse cancerosa. Así mismo, una acumulación excesiva de peróxido de hidrógeno en el cuerpo humano puede causar daños en

Sensibilidad de las muestras

los tejidos y fragmentación del ADN.[25], [26] Por esta razón, la detección del nivel de peróxido de hidrógeno en el cuerpo humano posee gran importancia.

Existen ya procedimientos para determinar el nivel de H_2O_2 en la orine para facilitar la detección de posibles enfermedades como el estrés oxidativo. [25][27].

6.1. Efecto H_2O_2

Como se ha indicado anteriormente, se conoce que la plata es sensible al peróxido de hidrógeno, pero no se conoce exactamente cuál es el efecto que provoca la reacción y si realmente se da modificación de color, que es lo que se busca para la aplicación. Por esta razón, se decide realizar unas pruebas orientativas con H_2O_2 para observar qué comportamiento provoca en las nanopartículas sintetizadas. Para ello se observaran las muestras utilizando un TEM.

Un microscopio electrónico de transmisión o TEM (siglas en inglés) es un microscopio que utiliza un haz de electrones para visualizar un objeto, lo que permite caracterizar tanto la morfología como la distribución de las nanopartículas en la muestra. Las muestras para el TEM fueron preparadas depositando una gota de las disoluciones en un soporte específico de cobre llamado grid y dejándolo secar a temperatura ambiente. La observación de las muestras TEM se realizó con un Carl Zeiss Libra 120.

El procedimiento a seguir va a ser el siguiente:

- Se decide que se va a realizar la adición de H_2O_2 , a una muestra con únicamente plata, a otra con únicamente oro y a una mezcla de ambas. Se toma la determinación de seleccionar muestras con el mismo polielectrolito actuando como agente encapsulante, ya que se considera que se realiza un procedimiento más estable debido a que se reduce la variable del medio encapsulante en la reacción simplificando de esta manera la misma.
- Se elige realiza la prueba con PAA, ya que es el encapsulante con el que se han obtenido mayor variedad de colores y por tanto, se cree que los cambios se van a apreciar con mayor claridad.
- Para la muestra con $AgNO_3$ se seleccionan muestras que presentan un color amarillo anaranjado Se van a tomar dos muestras en la que la única diferencia es el pH. Una de ellas presenta un pH base y la otra ácido, de esta forma se quiere observa cómo afecta esta variable en el comportamiento.

REF: PAA / $AgNO_3$ / 10mM / pH9 / [DMAB]=500 μ L (Amarillo-naranja)

REF: PAA / $AgNO_3$ / 10mM / pH5 / [DMAB]=500 μ L (Naranja)

- En el caso de las muestras con $HAuCl_4$, se va a realizar con dos disoluciones. Esta decisión se debe a que, como ya se ha indicado anteriormente, al realizar un barrido general de espectros de todas las muestras, las que a simple vista tiene un color violeta no presentan un pico perfectamente definido, algo no común en el oro y que no se esperaba, ya que se supone que se trabaja con partículas esféricas, que poseen solamente un pico. Por tanto, se toma una muestra con este color (para observar el efecto explicado en el apartado 3.4.) y otra con red wine, y se realiza el mismo proceso con ambos.

Sensibilidad de las muestras

REFvioleta: PAA/ HAuCl_4 / 10mM / pH 9 / [DMAB]=25 μL

REFredwine: PAA/ HAuCl_4 / 10mM / pH 9 / [DMAB]=500 μL

- Se obtiene 16 muestras

Se realizan UV-Vis a todas las muestras, para observar cómo evolucionan los picos tanto ante la adición de H_2O_2 , como al mezclar las disoluciones de Ag y Au. Se quiere analizar:

- Si al realiza las mezclas se van a observar ambos picos, el correspondiente a la plata y el correspondiente al oro.
- Si el cambio en la muestra de plata al añadir H_2O_2 con diferentes pH que se observa de manera visual, también modifica el pico de la misma.
- El comportamiento de los picos cuando se añade H_2O_2 , ya que aunque visualmente no se note un cambio significativo, quizá si se tenga a nivel nanoestructural.

Muestra 1: PAA / AgNO_3 / 10mM / pH5 / [DMAB]=500 μL



Muestra 2: PAA/ HAuCl_4 / 10mM / pH 9 / [DMAB]=25 μL



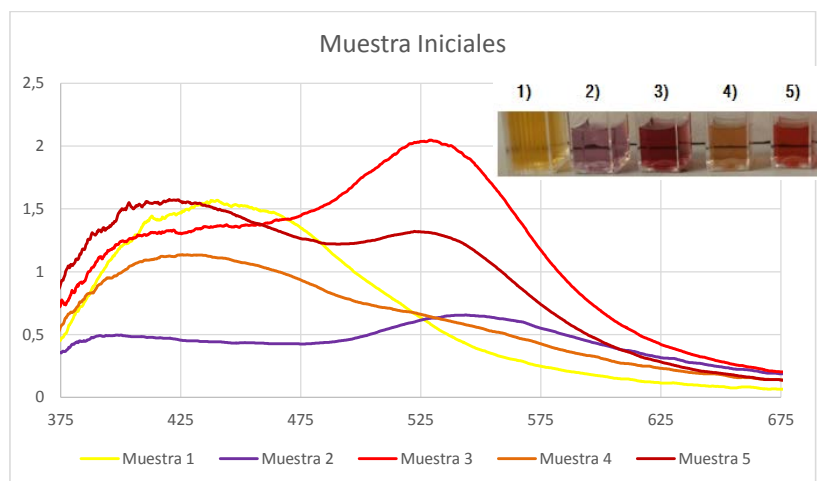
Muestra 3: PAA/ HAuCl_4 / 10mM / pH 9 / [DMAB]=500 μL



Muestra 4: Mezcla muestra 1 + muestra 2




Muestra 5: Mezcla muestra 1 + muestra 3





Gráfica 20: Espectros de las muestras de plata y oro de partida para el análisis del efecto del peróxido de Hidrógeno. En ellos cabe destacar que en la muestra 3, de color violeta, se pueden visualizar la influencia del puede grado de ionización del polielectrolito, al


Sensibilidad de las muestras


aparecer lo que puede parecer un segundo pico. También cabe destacar que en la muestra 5 se visualizan perfectamente ambos picos, característicos de la Ag y del Au.

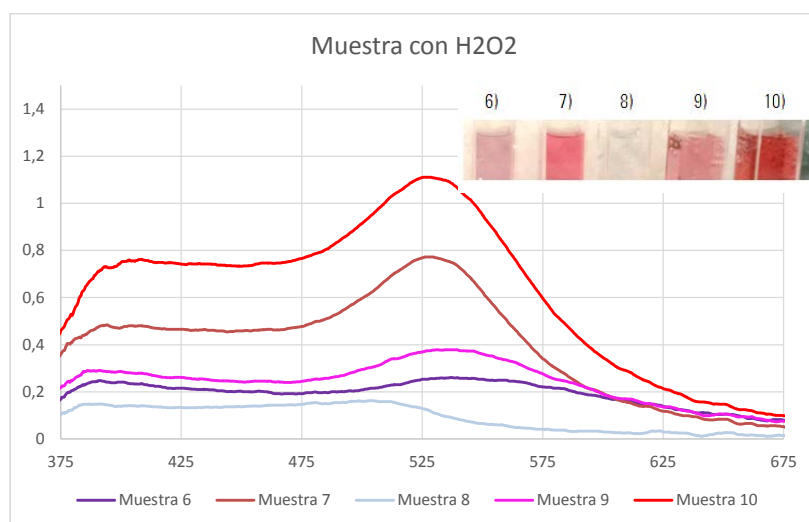
Muestra 6: Muestra 4 + H₂O₂ 

Muestra 7: Muestra 5 + H₂O₂ 

Muestra 8: Muestra 1 + H₂O₂ 


Muestra 9: Muestra 2 + H₂O₂ 


Muestra 10: Muestra 3 + H₂O₂ 





Gráfica 21: Espectro de las muestras de la Gráfica 20 con adición de H₂O₂. Se observa que cuando se añade H₂O₂, el pico de Ag sufre una caída significativa, que se aprecia visualmente en la pérdida de coloración instantánea (Muestra 8), mientras que el del Au se mantiene estable (muestra 7). También se observa que la muestra 6, que antes de añadir H₂O₂ a la mezcla, posee un color más parecido al de la plata, vuelve al tono violeta del oro con la adición de peróxido de Hidrógeno.

En las siguientes cinco muestras se repite el proceso pero cambiando la muestra de plata inicial, por una muestra que presenta el mismo color pero con un pH diferentes. En las muestras anteriores, se trabaja con nanopartículas de plata a pH 5 y en este caso, se quiere observar el comportamiento con una muestra a pH9. El resto de muestras iniciales son las mismas.

Muestra 11: PAA / AgNO₃ / 10mM / Ph9 / [DMAB]=500μL 

Muestra 12: Mezcla muestra 11 + muestra 2 

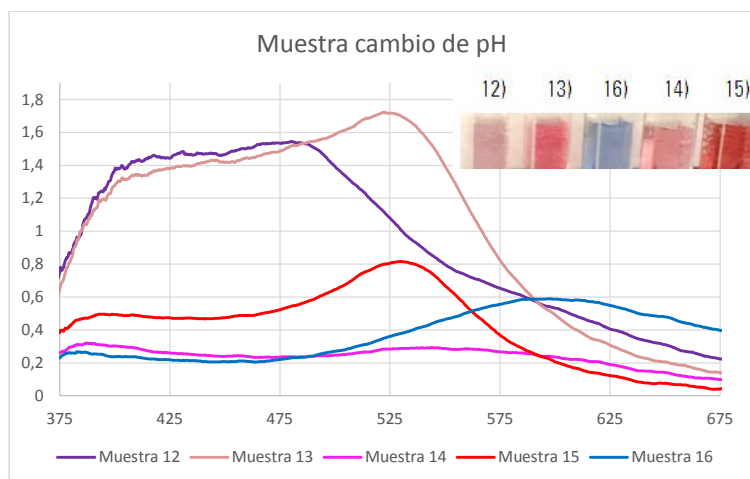
Muestra 13: Mezcla muestra 11 + muestra 3 

Muestra 14: Muestra 12 + H₂O₂ 

Sensibilidad de las muestras

Muestra 15: Muestra 13 + H₂O₂

Muestra 16: Muestra 11 + H₂O₂



Gráfica 22: Espectro de las muestras con el cambio de la muestra inicial de plata a pH 9. El cambio más significativo es en que en la muestra (11) al añadir H₂O₂ se torna en color azul y no se vuelve transparente como en el caso anterior. En el espectro se visualiza el pico característico de este color en torno a 600nm. Por la tanto, se confirma la influencia del pH en la reacción con H₂O₂. Al igual que en la anterior, la mezcla con el oro que presenta color violeta, recupera el color de este con la adición de H₂O₂.

Con las muestras anteriores se realiza unas pruebas en un TEM (Microscopio Electrónico de Transmisión), para observa la nanoestructura que presenta las mismas y poder realizar así un estudio relacionando colores y estructuras o comportamientos.

Solo se realizó el proceso TEM a las muestras que se creía que poseían una relevancia mayor.

Muestra 1: PAA / AgNO₃ / 10mM / pH5 / [DMAB]=500μL

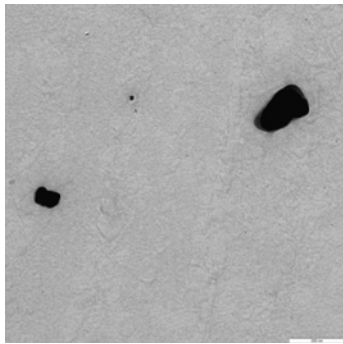


Ilustración 16: TEM muestra 1(x20000). Detalle de las partículas. Se tiene partículas de Ag de forma más o menos esferoidal que presentan diferentes tamaños, como se puede apreciar en la imagen.

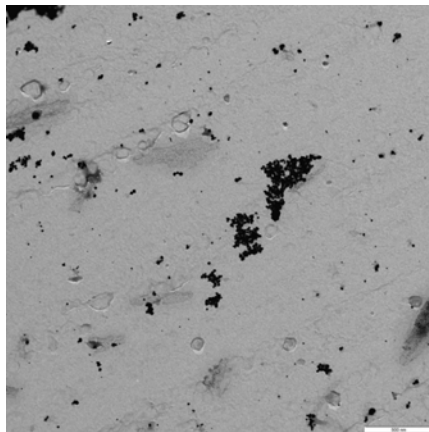


Ilustración 17: TEM muestra 1(x8000). Imagen general de la muestra. Como se puede observar no se tiene una densidad de partículas elevada. Además las partículas se presentan en algunas zonas aglomeradas.

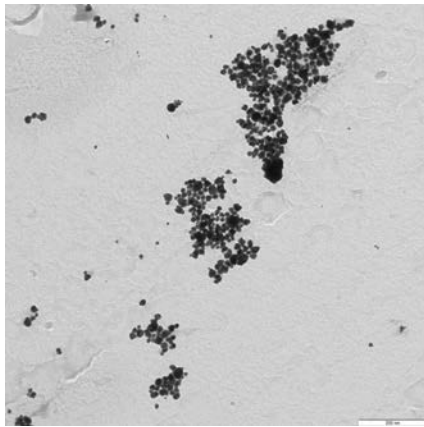


Ilustración 18: TEM Muestra1. (x20000). Detalle de las aglomeraciones de partículas de plata. Se observa que la aglomeración se produce en forma de ramificaciones o racimos.

Muestra 2: PAA/ HAuCl_4 / 10mM / pH 9 / [DMAB]=25 μL

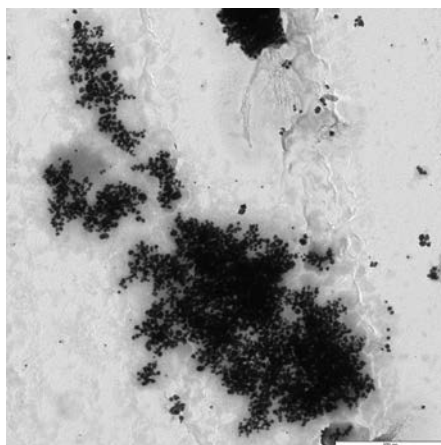


Ilustración 19: TEM Muestra2 (x12500). Como se puede observar claramente, se tienen partículas con forma esférica muy aglomeradas de manera ramificada. Se trata de la muestra de color violeta que se ha explicado en el apartado 3.4.

Muestra 3: PAA/ HAuCl_4 / 10mM / pH 9 / [DMAB]=500 μL

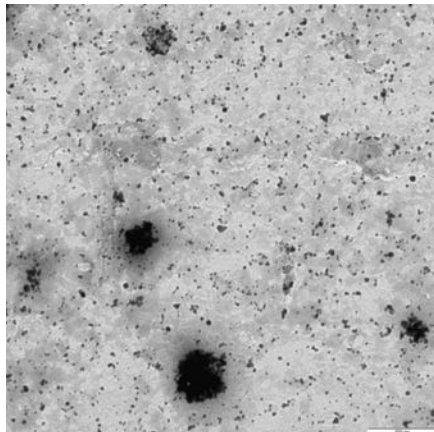


Ilustración 20: TEM Muestra 3 (x20000). Se observa una mayor densidad de partículas. Poseen también forma esferoidal y producen también aglomerados.

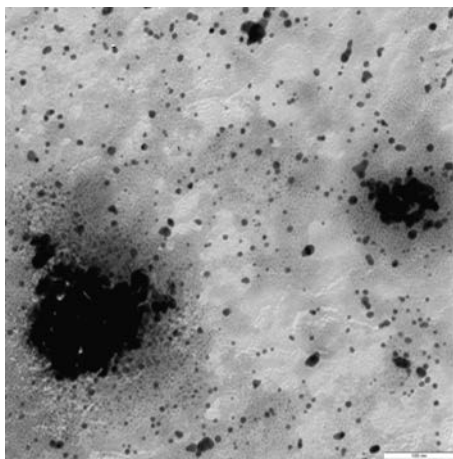


Ilustración 21: TEM Muestra 3 (x40000). Detalle de los aglomerados, se observa que a diferencia que en la muestra anterior, estos no se forma como racimos sino que presentan una forma más de pelotón.

Muestra 4: Mezcla muestra 1 + muestra 2

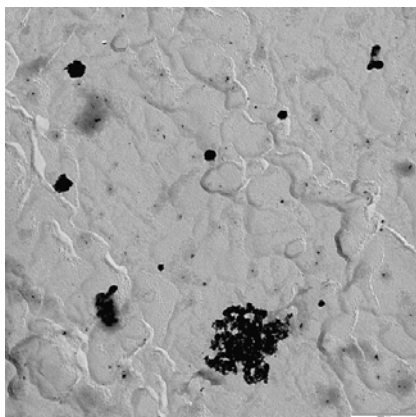


Ilustración 22: TEM Muestra 4 (20000). Esta imagen corresponde a una mezcla de partículas de oro y plata, se observa claramente que se mantiene la forma original de cada una de las partículas. Las partículas de mayor tamaño se corresponden con las de plata de la muestra 1 y los racimos, con las de oro de la muestra 2.

Muestra 6: Muestra 4 + H_2O_2

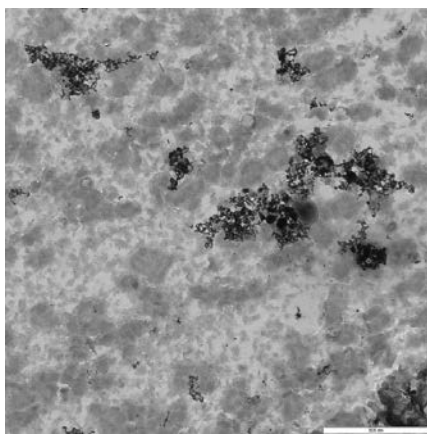


Ilustración 23: TEM Muestra 6 (x12500). Se observa claramente que la adición de H_2O_2 modifica la estructura de las muestras. Se obtiene una base grisácea que se cree que corresponde con el peróxido de hidrogeno. Se observa que ya no se obtiene partículas sino agrupamientos, por lo que parece que el H_2O_2 provoca la aglomeración de las partículas.

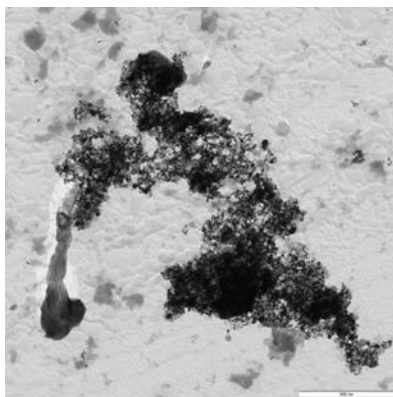


Ilustración 24: TEM Muestra 6 (x12500). Detalle de los aglomerados, aunque la forma de racimo se mantiene, las partículas de plata ya no presentan forma esferoidal, se podría decir que están más desintegradas. Además se corrobora lo dicho anteriormente que el H_2O_2 provoca el aglutinamiento de las partículas ya que en estos aglomerado también se observan las partículas de oro (negro más oscuro), que en la muestra anterior estaban separadas.

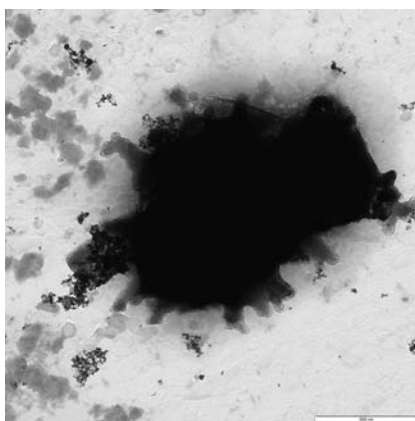


Ilustración 25: TEM Muestra 6 (x12500). En esta ilustración se observa de manera clara que el peróxido de hidrógeno ha provocado el agrupamiento de las partículas, esto correspondería a un aglomerado de partículas de oro, que poseen un tamaño mayor y que en la muestra inicial se presentaban alejadas

Muestra 9: Muestra 2 + H_2O_2

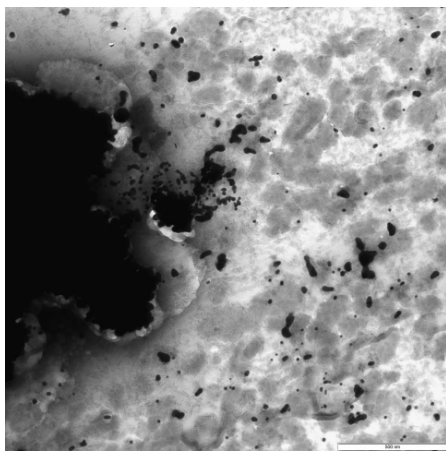


Ilustración 26: TEM Muestra 9 (x12500). Se corresponde con la muestra con partículas de oro de color violeta. Se observa que la adición de H_2O_2 provoca un cambio en la nanoestructura de la muestra. Ya no se observan los racimos sino aglomerados de mayor tamaño.

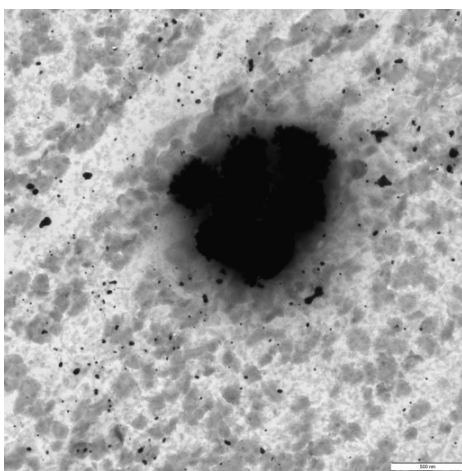


Ilustración 27: TEM Muestra 9 (x2000). Inicialmente, antes de la adición de H_2O_2 , la muestra presentaba partículas esféricas aglomeradas en forma de racimos. En este caso se observa que el peróxido de hidrógeno ha intensificado esta aglomeración y los racimos se han agrupado formando aglomerados con diámetro mayor a 500nm

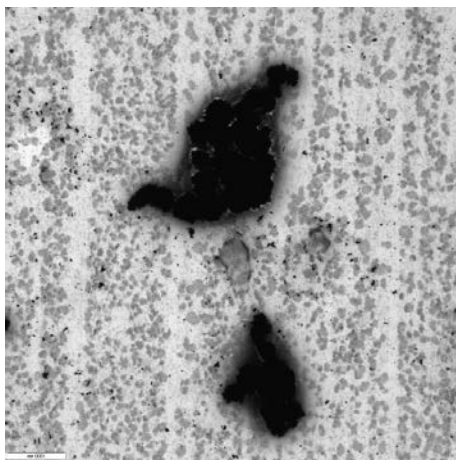


Ilustración 28: TEM Muestra 9 (x3200). Detalle de los aglomerados formados por la adición de H_2O_2 .

Muestra 16: Muestra 11 + H_2O_2

No se pudo realizar el TEM, de la muestra 11. Por lo que no se puede comparar el comportamiento antes y después de la adición de peróxido de hidrógeno.

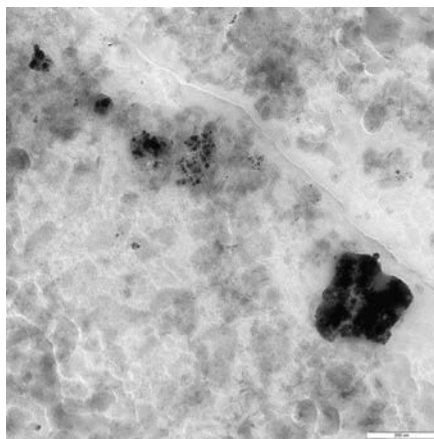


Ilustración 29: TEM Muestra 11 (x20000). Se observa que las partículas se encuentran aglomeradas, posiblemente debido a la acción del H_2O_2

CONCLUSIONES.

- Al mezclar muestras con partículas de Au y de Ag, se observan ambos tipos de partículas, como se corrobora en los espectros. Por tanto, se han sintetizado partículas lo suficientemente estables.
- Las partículas de plata presentan un tamaño mayor que las de oro.
- La adición de H_2O_2 provoca la aglomeración de las partículas. Se crea una base que presenta un tono gris más claro.
- En la muestra 2, donde se presentaban dos picos, se forman aglomeraciones con forma de racimos, lo que explica la aparición de un segundo pico o la observación de un pico no tan definido. (teoría del grado de ionización según el pH)
- La muestra 4, mezcla de la muestra 1 (plata) y la muestra 2 (oro), presenta claramente partículas de ambos elementos. A simple vista posee un color más parecido al amarillo de la muestra de Ag y en el espectro se observa únicamente un pico en torno a 450nm.

Sin embargo, la muestra 6, que es la muestra anterior, con la adición de H_2O_2 . Tiene un color violeta más parecido a la muestra de Au y en el espectro se observan claramente los dos picos. En la imagen TEM se observa que los racimos de partículas de Au se mantienen y que las partículas de plata se aglomeran con estos. Por lo tanto se confirma que la estabilidad del Au frente al H_2O_2 y la reacción de la Ag. Lo que sirve como prueba para continuar el proyecto de búsqueda de un sensor.

6.2. Pruebas H_2O_2

Una vez se ha seleccionado el agente reactivo y que se ha comprobado el efecto que tiene en las nanopartículas con las que se trabaja, se decide realizar la prueba definitiva para obtener un sensor colorimétrico. Como ya se ha indicado en los apartados anteriores se ha escogido el PDDA como el agente encapsulante que presentan las mejores condiciones para la realización de estas pruebas. También se realizan las pruebas con el PSS, ya que también se obtuvo un buen resultado a la hora de observar los dos picos.

Obtención de la mezcla óptima.

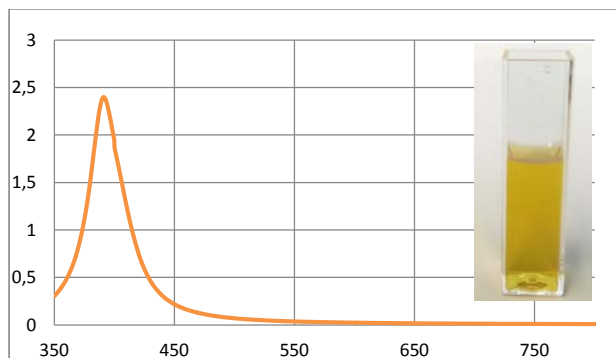
6.2.1. PSS

En el apartado 4, se seleccionaba el PDDA como el polielectrolito que poseía los mejores requisitos para la elaboración de la prueba de sensor colorimétrico con H_2O_2 . Sin embargo, el PSS también tenía buenas propiedades para la aparición de los dos picos.

El procedimiento seguido se detalla a continuación:

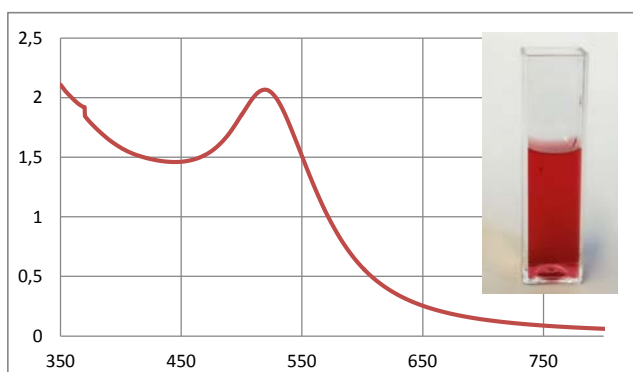
Muestra de plata: $AgNO_3$ / 10mM / pH9 / 50 μ L (DMAB) → Amarillo anaranjado

Sensibilidad de las muestras



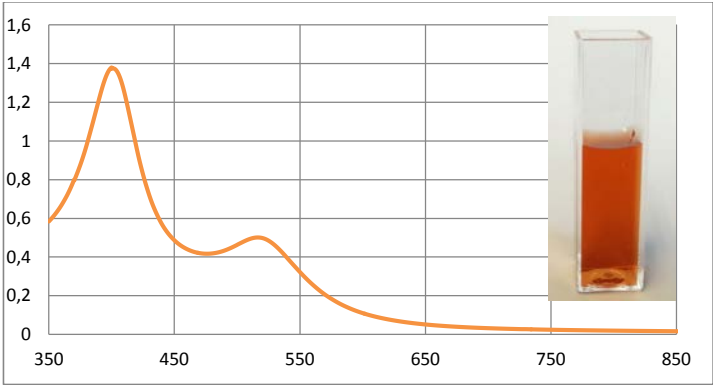
Gráfica 23: Espectro de la muestra de plata. Pico característico en 395nm.

Muestra de oro: HAuCl_4 / 25mM / pH7/ 500 μL (DMAB) \rightarrow Red Wine



Gráfica 24: Espectro de la muestra de oro. Pico característico en 525nm.

Sensibilidad de las muestras

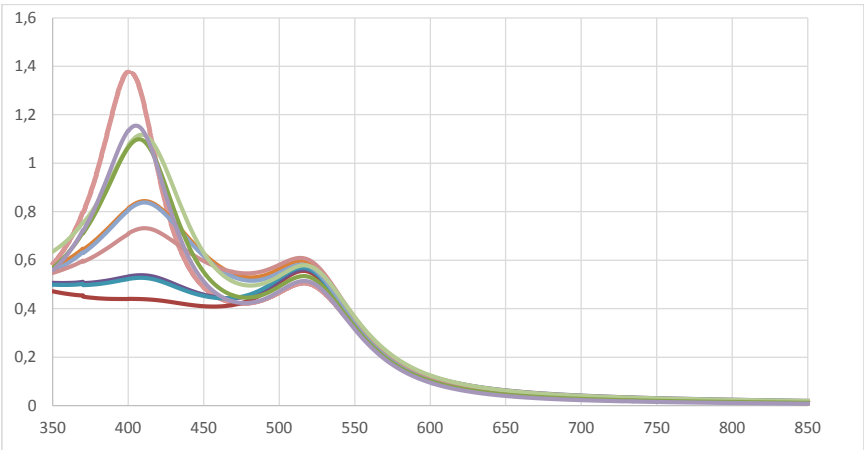


Gráfica 25: Espectro de la mezcla inicial con la que se va a trabajar. Al igual que antes, la muestra de plata debe ser diluida y la proporción de plata en la mezcla es mayor que la de oro.

En este caso se han querido tomar más factores de dilución del peróxido de hidrógeno para que visualmente la gráfica quedase más detallada. Se sigue partiendo igual que antes la muestra inicial con un factor 1:40. Los factores utilizados se indican a continuación.

Factor dilución	1	2	3	4	5	6	7		
H ₂ O ₂	1	1:5	1:10	1:20	1:50	1:100	1:200	1:500	1:1000
Muestra	1:40	1:200	1:400	1:800	1:2000	1:4000	1:8000	1:20000	1:40000

Tabla 1: Recoge los factores de dilución de las muestras utilizadas en la gráfica 10.



Gráfica 26: Grafica de sucesión de los espectros conforme se aumenta la concentración de H₂O₂.

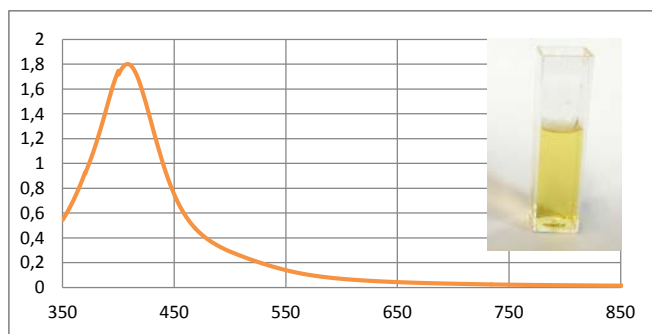


Ilustración 30: Transición gradual de colores desde el naranja de la mezcla inicial hasta el rojizo de la muestra con la concentración más elevada de agua oxigenada en PSS. En este caso se observa también de manera clara como la mezcla vira al color del Au cuando se añade el peróxido de hidrógeno.

6.2.2. PDDA

Una vez demostrada la capacidad sensora de las dispersiones combinadas de basadas en nanopartículas sintetizadas usando PSS como agente encapsulante se decidió realizar la misma prueba usando dispersiones basadas en PDDA, ya que en el capítulo 4 se vieron indicios que apuntaban a resultados mejorados. Se toman las muestras con las siguientes características.

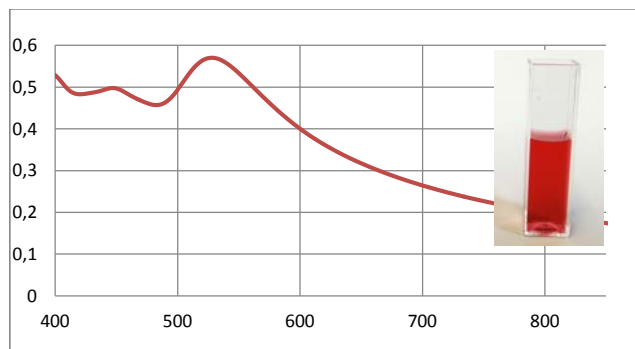
- **Muestra de Plata:** AgNO_3 / 25mM / pH9 / 500 μL (DMAB) \rightarrow Amarillo



Gráfica 27: Espectro de la muestra de plata pico característico en 405nm.

- **Muestra de Oro:** HAuCl_4 / 5mM / pH7/ 25 μL (DMAB) \rightarrow Red Wine

Sensibilidad de las muestras



Gráfica 28: Espectro de la muestra de oro pico característico en 540nm.

Inicialmente se realiza una prueba sencilla para comprobar el efecto que tiene el peróxido de hidrógeno por separado en el oro y en la plata. A las muestras de oro y plata y a la mezcla se les añade H_2O_2 en diferentes concentraciones, la más pequeña corresponde a 1:1000 y la mayor 1M. No se busca seguir ningún patrón específico simplemente demostrar visualmente el efecto del agua oxigenada.

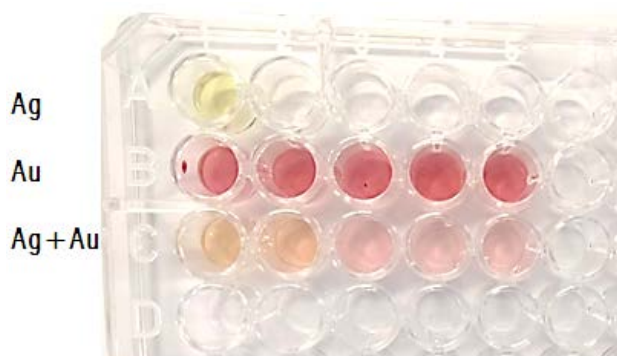


Ilustración 31: Efecto de la adición de H_2O_2 en las muestras con las que se está trabajando: plata, oro y la mezcla de ambos. Como se observa, la plata pierde su coloración por completo volviéndose transparente, mientras que la dispersión de oro se muestra muy estable. La dispersión combinada muestra un evidente cambio de color, a la vez que mantiene la referencia del oro.

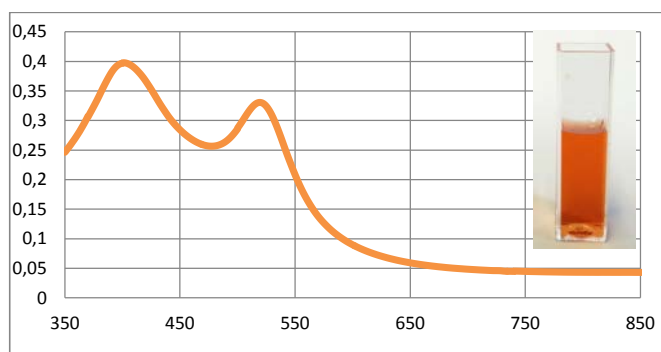
Como se puede ver en la Ilustración 26, las dispersiones de AgNPs van perdiendo su pico de absorción LSPR debido a su degradación (oxidación) con el H_2O_2 . Esta pérdida de color se produce incluso con la dilución más alta de H_2O_2 (1:1000). Sin embargo, en el oro no se produce un cambio de color apreciable ya que se mantiene el rojo. En el caso de la mezcla, se aprecia como el tono naranja inicial se transforma hacia un tono más rosado conforme aumenta la concentración de agua oxigenada. Por tanto, se confirma la teoría que también se había corroborado con las imágenes TEM, que las nanopartículas de Au se mantienen estables con la adición de H_2O_2 , ya que no pierde ni su coloración ni su pico

Sensibilidad de las muestras

característico. Sin embargo, la plata es altamente sensible a la adición de este compuesto y pierde por completo su coloración cambiando totalmente su espectro. En la mezcla de ambos compuestos, se observa como este efecto individual se mantiene y por esta razón, la mezcla torna al color del Au, ya que la plata reacciona.

Como se ha indicado anteriormente la realización de la mezcla no es un proceso trivial, ya que muchos factores influyen en su síntesis. Se debe destacar que en las mezclas con la que se va a trabajar, se han modificado algunos parámetros como el factor de disolución de las muestras o la proporción de cada muestra independiente para obtener el espectro deseado.

La muestra de plata es diluida 1:4 para evitar que la absorbancia sature en el espectro, debido a esta dilución se debe ajustar la proporción de la mezcla. En vez de realizar la mezcla utilizando la mitad de plata y la mitad de oro, se debe aumentar la proporción de la muestra de plata (2/3) para obtener el pico con una absorbancia mayor que el del oro (1/3). Se obtiene de esta forma la siguiente mezcla que presenta un color anaranjado.



Gráfica 29: Espectro de la mezcla inicial. Se obtienen los dos picos perfectamente definidos.

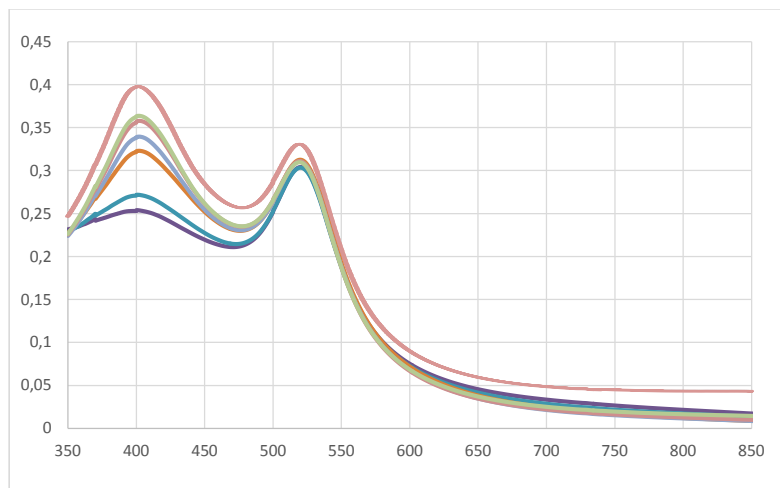
La prueba que se va a realizar se basa en los siguientes pasos:

- Se introduce en una probeta 1,950mL de la mezcla
- Se mezcla con 50 μ L de H₂O₂ a diferentes concentraciones.

Por tanto, en disolución se tiene la mezcla a una dilución 1:40. En función de la concentración de peróxido de hidrógeno esta dilución se irá aumentando hasta obtener un límite en que la mezcla ya no sufra modificaciones y se considere que se ha llegado al límite de detección, por debajo de este límite la mezcla no es sensible al peróxido de Hidrógeno.

Factor dilución	1	2	3	4	5	6
H ₂ O ₂	1:20	1:50	1:100	1:200	1:500	1:1000
Muestra	1:800	1:2000	1:4000	1:8000	1:20000	1:40000

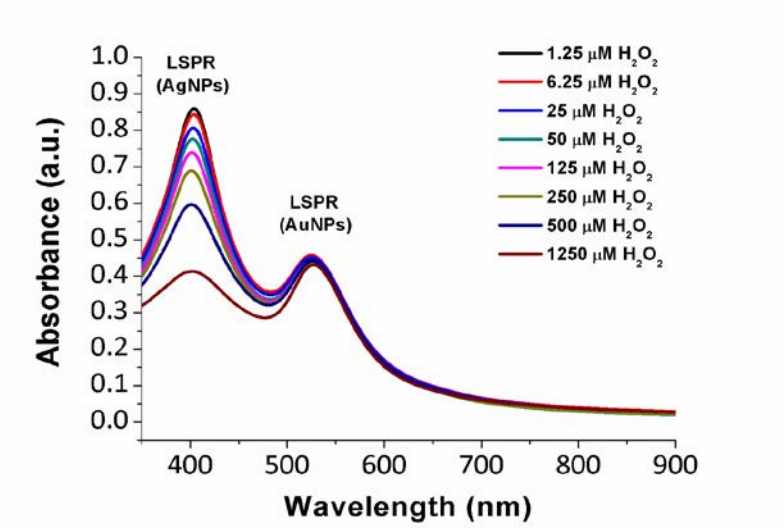
Tabla 2: Recoge los factores de disolución de las muestras finales y las diferentes concentraciones de H₂O₂ utilizadas.



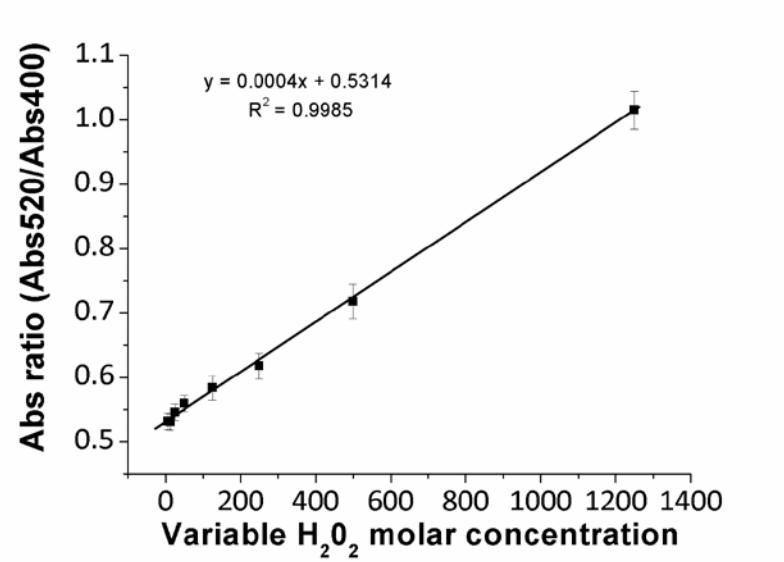
Gráfica 30: Sucesión de espectros con la adición de H_2O_2 en diferentes concentraciones.

Como se esperaba, el pico de plata desciende conforme aumenta la concentración de H_2O_2 mientras que el del oro permanece prácticamente estable. Esta gráfica corresponde a los datos de la primera prueba que se realizó. Una vez se determinó el procedimiento y se corroboró que se cumplía el efecto deseado, se repitió el proceso con el objetivo de obtener unos resultados más depurados y ser capaces de estimar un valor del límite de detección del sistema sensor.

Para determinar el límite de detección es necesario conocer la desviación típica de las medidas para cada valor de concentración de peróxido de hidrógeno. Esta variabilidad nos proporciona una idea de la precisión del sensor, y como es bien conocido, esto hará que el límite de detección sea mayor cuanto más preciso sea el sistema de medida (menos variabilidad tengan los datos para una misma concentración). Hay que decir que en este proceso de estimación de la precisión del sensor se acumulan a la variabilidad propia del sensor en sí todos los errores experimentales que son inevitables, como por ejemplo el error de dosificación de las micropipetas del laboratorio, pero que en una fase posterior de este estudio podrían ser optimizados. Así, las medidas de sensibilidad fueron repetidas, pero esta vez por triplicado, de manera que a continuación se incluyen los resultados obtenidos con estas pruebas.



Gráfica 31: En esta gráfica se puede observar lo datos obtenidos en la repetición de la prueba inicial. Se comprueba que el efecto es el mismo y el pico de oro actúa como referencia, sin prácticamente sufrir ninguna modificación, mientras que el de la plata decrece conforme aumenta la concentración de H_2O_2 .



Gráfica 32: Como se ha indicado anteriormente, se repitió el proceso para obtener las medidas por triplicado y poder realizar esta gráfica que representa la tendencia lineal del ratio de absorbancia (Abs 520/Abs 400) en función del cambio de concentración molar de H_2O_2 de 1,25 μM a 1250 μM .

Sensibilidad de las muestras

Además de esta relación lineal se obtiene un Límite de detección (LOD) de $1.2\mu\text{M}$, basado en la cantidad mínima de H_2O_2 que puede provocar cambio en el ratio de absorbencia (tomando 3 veces la desviación estándar). Es importante comparar que este límite de detección es comparable con el límite de detección de $1\mu\text{M}$ recogido en anteriores trabajos [28], [29], aunque es menos sensible que el obtenido en otros [30], [31], que utilizan únicamente nanopartículas de plata. Por lo tanto, se puede considerar que el sensor posee un valor de sensibilidad dentro del intervalo en el que se está trabajando en este tipo de campo de los biosensores, utilizando además nanopartículas de los dos metales, oro y plata.

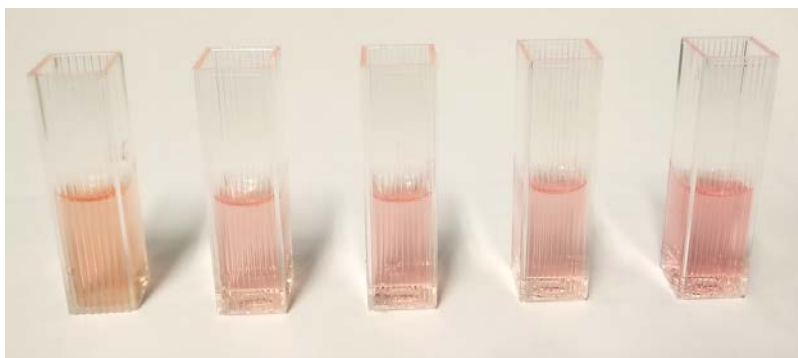


Ilustración 32: Transición gradual de colores en las muestras desde la muestra inicial sin H_2O_2 . La dilución máxima que se ha probado 1:1000 y se llega hasta la máxima concentración de peróxido de hidrogeno 1M, donde como se observa se obtiene el color rosado más intenso.

Se debe destacar que el cambio de color se produce prácticamente de manera instantánea, en las concentraciones altas de peróxido de hidrogeno se observa nada más añadir la gota, en las diluciones más altas no llega a tardar ni un minuto. También se debe indicar que el efecto que se observa en los espectros no se mantiene con el tiempo, sino que con el paso del tiempo el pico de la plata decae en todas las concentraciones y solo se mantiene el del oro, aunque el nuevo color rosado de la mezcla sí que permanece en el tiempo.



Ilustración 33: Diferencia de color entre la mezcla inicial sin H_2O_2 (naranja) y una muestra con peróxido de hidrógeno. Se observa que la adición de agua oxigenada provoca que la mezcla vuelva al color inicial del Au.

Conclusiones y líneas futuras

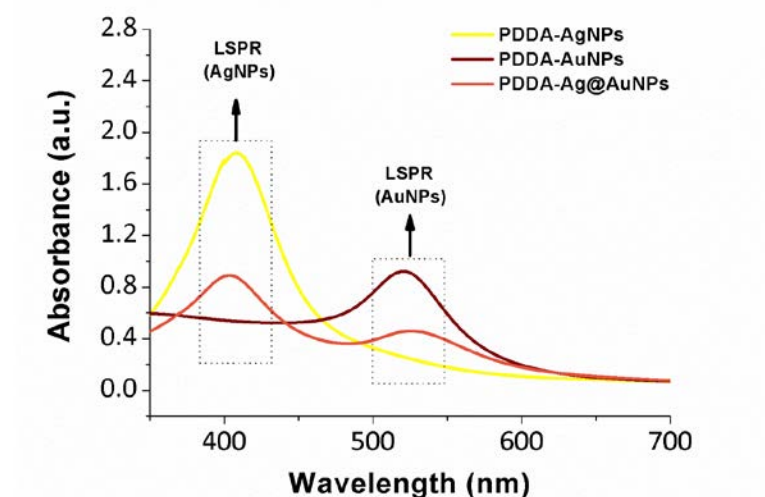
7. Conclusiones y líneas futuras.

A continuación se detallarán las conclusiones de este trabajo, así como las líneas futuras para su posible continuación.

Conclusiones

Como se ha podido comprobar el enfoque del trabajo ha permitido organizar el proyecto en diferentes etapas hasta obtener el sensor óptico colorimétrico. La realización de cada etapa conlleva el cumplimiento de objetivos intermedios que poseen una importancia fundamental para la realización satisfactoria del mismo.

- Realizar un análisis exhaustivo de las diferentes matrices de síntesis de colores que se pueden obtener con nanopartículas de oro y plata utilizando diferentes agentes encapsulantes, variando diferentes parámetros, principalmente la concentración, tanto de polielectrolito como de agente reductor, así como el pH.
- Sintetizar nanopartículas de oro y plata estables en disolución.
- Corroborar que la plata presenta una paleta de colores mayor, así como el fenómeno del blue silver. Mientras las partículas de oro se caracterizan únicamente por poseer el color red wine.
- Obtener en una única muestra ambos tipos de nanopartículas visualizando de manera clara los dos picos característicos.
- Obtención de un sensor óptico colorimétrico de Peróxido de Hidrógeno de reacción instantánea con doble referencia, basado en nanopartículas de oro y plata.
- Obtener un Límite de detección (LOD) de $1.2\mu\text{M}$, que se encuentra entre los valores con los que se trabaja en este campo de biosensores.
- Obtener una aplicación innovadora ya que no se encuentra referencias de un biosensor de H_2O_2 autoreferenciable al utilizar nanopartículas de oro y plata al mismo tiempo.
- Realización de un artículo de investigación completo que va a ser enviado para su posible publicación en una revista internacional con índice de impacto.



Gráfica 33: Esta gráfica resume el trabajo realizado con el LSPR de las nanopartículas de oro y plata.

Líneas futuras.

Una vez realizado este paso en disolución, se considera la opción de obtener el mismo sensor pero depositando las nanopartículas en films, mediante la técnica Layer-by-Layer [32][30]. Se trata de una de las técnicas más conocida para la creación de estructuras con multicapas en films. [32] Sin embargo, tras la realización de algunas pruebas con un robot 3D, los resultados obtenidos no resultaron satisfactorios, ya que no se observaban los picos en los espectros. Se considera un proceso más complicado y preciso que el de vía rápida, ya que es necesario el control exigente de muchos factores como la molaridad de las disoluciones, el pH y el número de capas. En este caso, no se consiguió optimizar el proceso para obtener un resultado reseñable. A pesar de ello, se cree en la posibilidad de llegar a obtener una deposición satisfactoria de las nanopartículas y la obtención del sensor buscado en films si se continua en la investigación del campo.

Con formato: Fuente:

Bibliografías

8. Bibliografía.

- [1] J. C. Moghimi, S. M.; Hunter, A. C.; Murray, "Nanomedicine: Current Status and Future Prospects.," *FASEB J.*, vol. 19, pp. 311–330., 2005.
- [2] M. C. Roco, "Nanotechnology: Convergence with Modern Biology and Medicine.," *Curr. Opin. Biotechnol.*, vol. 14, pp. 337–346, 2003.
- [3] L. M. Grzelczak, M.; Vermant, J.; Furst, E. M.; Liz-Marzán, "Directed Self-Assembly of Nanoparticles.," *ACS Nano*, vol. 4, 3591–36, 2010.
- [4] J. Sau, T. K.; Rogach, A. L.; Jäckel, F.; Klar, T. A.; Feldmann, "Properties and Applications of Colloidal Nonspherical Noble Metal Nanoparticles.," *Adv Mater*, vol. 22, 1805–1, 2010.
- [5] A. L. Sau, T. K.; Rogach, "Nonspherical Noble Metal Nanoparticles: Colloid-Chemical Synthesis and Morphology Control.," *Adv Mater*, vol. 22, 1781–1, 2010.
- [6] D. Daniel, M. -.; Astruc, "Gold Nanoparticles: Assembly, Supramolecular Chemistry, Quantum-Size-Related Properties, and Applications Toward Biology, Catalysis, and Nanotechnology.," *Chem. Rev.*, vol. 104, pp. 293–346., 2004.
- [7] M. A. Dreaden, E. C.; Alkilany, A. M.; Huang, X.; Murphy, C. J.; El-Sayed, "The Golden Age: Gold Nanoparticles for Biomedicine.," *Chem. Soc. Rev.*, vol. 41, pp. 2740–2779, 2012.
- [8] C. A. Kim, D.; Daniel, W. L.; Mirkin, "Microarray-Based Multiplexed Scanometric Immunoassay for Protein Cancer Markers using Gold Nanoparticle Probes.," *Anal. Chem.*, vol. 81, pp. 9183–9187., 2009.
- [9] L. Byrne, J. D.; Betancourt, T.; Brannon-Peppas, "Active Targeting Schemes for Nanoparticle Systems in Cancer Therapeutics.," *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 60, pp. 1615–1626, 2008.
- [10] R. L. Storhoff, J. J.; Elghanian, R.; Mucic, R. C.; Mirkin, C. A.; Letsinger, "One-Pot Colorimetric Differentiation of Polynucleotides with Single Base Imperfections using Gold Nanoparticle Probes.," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 120, 1959-, 1998.
- [11] D. Li, Y. Dong, B. Li, Y. Wu, K. Wang, and S. Zhang, "Colorimetric sensor array with unmodified noble metal nanoparticles for naked-eye detection of proteins and bacteria.," *Analyst*, vol. 140, no. 22, pp. 7672–7, Nov. 2015.
- [12] J. Park, I. Choi, Y. Kim, and J. Yi, "Colorimetric Determination of pH Values using Silver Nanoparticles Conjugated with Cytochrome c.," vol. 32, no. 9, pp. 3433–3436, 2011.
- [13] L. M. Rodríguez-Lorenzo, L.; Álvarez-Puebla, R. A.; De Abajo, F. J. G.; Liz-Marzán, "Surface Enhanced Raman Scattering using Star-Shaped Gold Colloidal Nanoparticles.," *J. Phys. Chem. C*, vol. 114, 7336-, 2010.
- [14] T. Jana, N. R.; Pal, "Anisotropic Metal Nanoparticles for use as Surface-Enhanced Raman Substrates.," *Adv Mater*, vol. 19, 1761–1, 2007.
- [15] M. T. N. Moritz, M.; Geszke-Moritz, "Achievements in Synthesis, Immobilization and Practical Applications of Antibacterial Nanoparticles.," *Chem. Eng. J.*, vol. 228, pp. 596–613., 2013.
- [16] M. J. Morones, J. R.; Elechiguerra, J. L.; Camacho, A.; Holt, K.; Kouri, J. B.; Ramírez, J. T.; Yacaman, "The Bactericidal Effect of Silver Nanoparticles.," *Nanotechnology*, vol. 16, pp. 2346–2353, 2005.
- [17] R. P. Anker, J. N.; Hall, W. P.; Lyandres, O.; Shah, N. C.; Zhao, J.; Van Duyne, "Biosensing with Plasmonic Nanosensors.," *Nat. Mater.*, vol. 7, pp. 442–453, 2008.
- [18] L. M. Liz-Marzán, "Nanometals: Formation and Color. Materials Today," vol. 7, pp. 26–31, 2004.
- [19] L. M. Angelomé, P. C.; Mezerji, H. H.; Goris, B.; Pastoriza-Santos, I.; Pérez-Juste, J.; Bals, S.; Liz-Marzán, "Seedless Synthesis of Single Crystalline Au Nanoparticles with Unusual Shapes and Tunable LSPR in the Near-IR.," *Chem. Mater.*, vol. 24, pp. 1393–1399, 2012.

Bibliografias

- [20] G. M. Gates, B. D.; Xu, Q.; Stewart, M.; Ryan, D.; Willson, C. G.; Whitesides, "New Approaches to Nanofabrication: Molding, Printing, and Other Techniques.," *Chem. Rev.*, vol. 105, pp. 1171–1196., 2005.
- [21] H. Kamiya, S.; Takahashi, H.; Saka, M.; Abé, "Evaluation and Improvement of the Adhesive Fracture Toughness of CVD Diamond on Silicon Substrate.," *J Electron Packag. Trans ASME*, vol. 124, pp. 271–276, 2002.
- [22] K. Shrivastava, S. Sahu, A. Ghorai, and R. Shankar, "Gold nanoparticles-based colorimetric determination of cationic surfactants in environmental water samples via both electrostatic and hydrophobic interactions," *Microchim. Acta*, vol. 183, no. 2, pp. 827–836, 2015.
- [23] A. Henglein, "Non-metallic silver clusters in aqueous solution: stabilization and chemical reactions," *Chem. Phys. Lett.*, vol. 154, no. 5, pp. 473–476, Feb. 1989.
- [24] B. G. Ershov and A. Henglein, "Reduction of Ag⁺ on polyacrylate chains in aqueous solution," *J. Phys. Chem. B*, vol. 102, no. 52, pp. 10663–10666, 1998.
- [25] A. D. Tabner BJ, Turnbull S, El-Agnaf OMA, "Formation of hydrogen peroxide and hydroxyl radicals from Aβ and α-synuclein as a possible mechanism of cell death in Alzheimer's disease and Parkinson's disease.," *Free Raducal Bio Med*, vol. 32:1076–10, 2020.
- [26] H. H. S. T. S. N. E. Y. Uchiyama Y, "Free radical-independent protection by nerve growth factor and Bcl-2 of PC12 cells from hydrogen peroxide-triggered apoptosis.," *J. Biochem.*, vol. 120, no. 3, pp. 540–546, 1996.
- [27] V. S. Ramachandran S, Morris SM, Devamanoharan P, Henein M, "Radio-isotopic determination of hydrogen peroxide in aqueous humor and urine.," *Exp Eye Res.*, vol. 53: 503–50, 1991.
- [28] C. Vasileva, P.; Donkova, B.; Karadjova, I.; Dushkin, "Synthesis of Starch-Stabilized Silver Nanoparticles and their Application as a Surface Plasmon Resonance-Based Sensor of Hydrogen Peroxide.," *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp.*, vol. 382, pp. 203–210, 2011.
- [29] D. Filippo, E.; Serra, A.; Manno, "Poly(Vinyl Alcohol) Capped Silver Nanoparticles as Localized Surface Plasmon Resonance-Based Hydrogen Peroxide Sensor.," *Sens Actuators, B Chem*, vol. 138, pp. 625–630, 2009.
- [30] Z.-. Wang, G. -.; Zhu, X. -.; Jiao, H. -.; Dong, Y. -.; Li, "Ultrasensitive and Dual Functional Colorimetric Sensors for Mercury (II) Ions and Hydrogen Peroxide Based on Catalytic Reduction Property of Silver Nanoparticles.," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 31, pp. 337–342, 2012.
- [31] T. Endo, T.; Shibata, A.; Yanagida, Y.; Higo, Y.; Hatsuzawa, "Localized Surface Plasmon Resonance Optical Characteristics for Hydrogen Peroxide using Polyvinylpyrrolidone Coated Silver Nanoparticles.," *Mater Lett*, vol. 64, pp. 2105–2108, 2010.
- [32] P. Podsiadlo, M. Michel, K. Critchley, S. Srivastava, M. Qin, J. W. Lee, E. Verploegen, A. J. Hart, Y. Qi, and N. A. Kotov, "Diffusional self-organization in exponential layer-by-layer films with micro- and nanoscale periodicity," *Angew. Chemie - Int. Ed.*, vol. 48, no. 38, pp. 7073–7077, 2009.